

**Nephelometrische Untersuchungen
über die Wirkungsweise
gerinnungsaktiver Substanzen im Urin**

Günter Fröhlich

=

1965

Aus der II. medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main

Direktor: Professor Dr. Frey

Nephelometrische Untersuchungen
über die Wirkungsweise
gerinnungsaktiver Substanzen im Urin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades
der gesamten Medizin
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Günter Fröhlich
aus Frankfurt am Main

1964

Dekan: Prof.Dr.med.H.Frick
Referent: Prof.Dr.med.J.Jürgens
Korreferent: Prof.Dr.med.W.Rotter
Mündliche Prüfung: 15.3.1965

Meinem verehrten Doktorvater

Herrn Prof. Dr. J. Jürgens

danke ich für die mir jederzeit
gewährte freundliche Unterstützung
und kritische Leitung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Frey danke ich für die
Erlaubnis, die Arbeit an seiner Klinik
durchführen zu dürfen.

I N H A L T

Nephelometrische Untersuchungen über die Wirkungsweise gerinnungsaktiver Substanzen im Urin

PROBLEMSTELLUNG und EINLEITUNG

I. THEORETISCHER TEIL

A. Nephelometrie

1. Definition und Gesetzmäßigkeiten. 6
2. Diskussion physikalischer Faktoren
 - a) Teilchenzahl N und Volumen v 8
 - b) Die eingestrahlte Lichtintensität J_0
und die Wellenlänge des Lichtes 10
 - c) Streulichtmessung bei gefärbtem
Dispersionsmittel 11

B. Theorie der Fibrinogen-Fibrinumwandlung 17

C. Definition der Gerinnung 21

II. METHODISCHER TEIL

A. Präparation des Plasmas 22

B. Wahl des Puffers 23

C. Vorbehandlung des Urins 24

D. Apparaturen 24

E. Versuchstechnik und Kurvenauswertung

1. Versuchsansatz 25
2. Charakterisierung der Normalkurve 26
3. Auswertung 29
4. Streubreite 30

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A.	Ionenmilieu und Plasmakonzentration	
1.	Rekalzifizierungszeit und Konzentration der Kalziumionen	31
2.	Natrium- und Chlorionenkonzentration . . .	36
3.	Plasmakonzentration	38
B.	Der Einfluß des Urins	
1.	Nephelometrische Untersuchungen	40
2.	Reagenzglasversuche	43
3.	Einfluß des Harnstoffs	44
4.	Bewertung der Versuche	45
C.	Verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Uringerinnseln	
1.	Festigkeit und Elastizität	47
2.	Wasserretension und Retraktion	47
3.	Oberflächenhaftung; Rigidität	50
4.	Auflösbarkeit in Harnstoff	51
IV.	<u>DISKUSSION</u>	53
V.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	59
VI.	Literaturverzeichnis	60

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Untersuchungen über die Wirkungsweise gerinnungsaktiver Substanzen des Urins erscheinen vielleicht auf den ersten Blick mehr von akademischem Interesse als von praktischem Nutzen. Die außerordentliche Bedeutung, die jedoch der Erforschung dieses Problems zukommt, ergibt sich im Zusammenhang mit der Frage nach der Entstehung der Harnzylinder. Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Harnzylindern und Gerinnungsvorgängen ist schon vor fast 100 Jahren hingewiesen worden (6,21).

Verschiedene Autoren versuchten die chemische Genese von Harnzylindern durch deren unterschiedliches färbereiches Verhalten zu klären (6,25,33). Es stellte sich dann heraus, daß die sog. Weigertsche Fibrinfärbung als unspezifisch anzusehen ist (11,22,26).

Eine Reihe von Autoren war der Auffassung, daß die Harnzylinder grundsätzlich kein Fibringerinnungsprodukt darstellten, sondern dachten an eine Verklebung degenerativ veränderter Blutzellen oder Verfettung von Tubulusepithelien (2,3,12,15,19).

Die heute übliche Einteilung der Harnzylinder nach den Kriterien der mikroskopischen Morphologie stellt lediglich eine formale Klassifizierung dar. Es bestehen nämlich zwischen den einzelnen Zylinderarten fließende Übergänge und man könnte daran denken, daß für viele morphologisch unterschiedliche Zylinderarten ein gleicher oder doch ähnlicher Entstehungsmodus zugrunde liegen könnte. Man teilt ein in echte Zylinder und Pseudozylinder. Echte Zylinder sind an ihren Enden abgerundet, Pseudozylinder sind verzweigt oder aufgefasert. Bei den echten Zylindern unterscheidet man: Granulierte Zylinder; Zellzylinder (Erythro-

zytenzylinder, Epithelzylinder, Wachszyylinder usw.). Die Zylinder sind fast ausnahmslos renalen Ursprungs und werden als Ausgüsse der distalen Tubuli und Sammelkanälchen aufgefaßt.

Einen neuen Anstoß erhielt die Zylinderforschung als 1947 Mac Farlane und Pilling (23) fanden, daß der Urin eine fibrinolytische Aktivität besitzt. 1952 konnten Astrup und Sterndorff (1) die Urokinase als wirksames fibrinolytisches Prinzip nachweisen. Der Zusammenhang der fibrinolytischen Aktivität des Urins mit dessen pH und Gehalt an Uropepsin wurde näher untersucht (16,24). Weiter wurde festgestellt, daß der normale Urin auch eine thromboplastische Aktivität besitzt (14). Frey und Jürgens (8) nehmen an, daß die thromboplastische Aktivität des Urins auf die Wirkung einer Gewebethrombokinasen und einen Aktivator des Prothrombins zurückzuführen ist.

Gibt es einen dem fibrinolytischen System des Blutes entsprechenden Schutzmechanismus in der Niere? Besitzt die gesunde funktionstüchtige Niere ein regulatorisches System, das die Entstehung oder Festsetzung von Fibrinthromben in den Nierenkanälchen physiologischerweise verhindert?

Eine Arbeitshypothese, bei der die Existenz eines fibrinolytischen Prinzips in der Niere gefordert wird, könnte sich auch als Irrweg erweisen. Es ist logisch auch denkbar, daß ein solches Prinzip nicht vorhanden ist und die Entstehung von Gerinnungsprodukten in den Nierentubuli ein zwangsläufiges Geschehen darstellt, sofern einmal die Voraussetzungen für einen Gerinnungsvorgang, nämlich der Übertritt von Blut oder Plasma aus dem Gefäßsystem in das exkretorische System der Nierenkanälchen, gegeben sind;

ein nach Konzentration und Art der beteiligten Substanzen vielfach modifizierter Vorgang also, dessen Ursache nicht durch das Versagen von einem "Schutzmechanismus der Niere" zustande käme, sondern in andern vorgeschalteten pathologischen Funktionen der Niere und des Stoffwechsels zu suchen wäre. Die Frage nach der Art von Gerinnungsvorgängen bei der Harnzylinderbildung ist somit nur ein Teilproblem.

Das Gerinnungsprodukt Fibrin könnte ein wichtiger Faktor für bestimmte Zylinderbildungen sein, indem es gewissermaßen als Kittsubstanz für korpuskuläre Bestandteile fungiert.

Das mechanische Moment der Verstopfung der ableitenden Harnwege ist das Gemeinsame bei jeder Zylinderbildung. Entsprechend der jeweiligen Bedeutung von Gerinnungsvorgängen für die Verstopfung der distalen Tubuli und Sammelkanälchen könnte man eine Skala aufstellen, an deren Spitze die Zylinderbildung bei Hämphilie steht, bei der es auch zu massiver Verstopfung von Nierenbecken und Ureter durch Blutkoagula kommen kann. Auch bei den Zylinderbildungen bei Nephritis oder den Hämoglobinzyklindern der Crush-Niere scheinen Gerinnungsvorgänge ein wesentliches Moment zu sein. Am Ende der Skala wären Zylinderbildungen kristalliner Stoffe wie z.B. Kalkzylinder bei Morbus Recklinghausen oder Harnsäurezyklinder bei der Gicht zu nennen, deren Entstehung durch Ausfällung der betreffenden Substanzen aus einer übersättigten Lösung erklärt werden können und die Beteiligung von Gerinnungsvorgängen zunächst unwahrscheinlich erscheint.

Neueste Untersuchungen von Herrmann (1b) über den sog. Harnsäureinfarkt der Niere ergaben, daß die vorwiegend aus Ammoniumurat bestehenden 4-36 μ .großen Sphärolithe von einem feinen Gerüst aus Mucoproteiden

- 4 -

durchzogen sind und von gleichen Substanzen sowie sauren Mucopolysacchariden zu Zylindern gefaßt sind. Harnmucoide sollen demnach sowohl am Aufbau des einzelnen Kristalloids als auch an der Zusammensetzung der intratubulären Zylinder wesentlich beteiligt sein. Da ähnliche organische Substanzen als Steinmatrix auch in primären Harnsteinen nachgewiesen werden konnten, kann aus strukturellen Ähnlichkeiten zwischen primären Harnsteinen und Harnsäurezylindern auf eine analog formale Genese der Konkreme geschlossen werden. Demnach wären die Harnsäurezylinder als intrarenale Mikrolithiasis aufzufassen. Möglicherweise sind gleichzeitige Mehrausscheidungen von Harnsäure und mucoiden Stoffen wesentliche Voraussetzungen für die Entstehung der Kristalloide.

Eine den komplizierten Funktionen und variablen Leistungen der Niere entsprechende Versuchsanordnung ist im Labor nicht möglich; wir können aber prüfen, welche Änderungen der Gerinnungsablauf unter der Anwesenheit von Urin erfährt.

Bezüglich des Aussagewertes einer solchen Untersuchung müssen von vornherein Einschränkungen gemacht werden. Vorausgesetzt ist die Annahme, daß etwa in der Niere wirksame gerinnungsaktive Substanzen wenigstens teilweise unverändert im Urin gefunden werden können. Es wäre auch denkbar, daß es sich dabei um chemisch sehr labile Substanzen handeln könnte, die von den Zellen des Tubulussystems der Niere aus eine unmittelbare lokale Wirkung hätten und auf Grund ihrer chemischen Labilität im Harn nicht mehr nachweisbar wären. Weiter ist daran zu denken, daß die in vitro gemachten Versuche von den in vivo gegebenen Verhältnissen stark abweichen und Rückschlüsse deswegen sehr vor-

sichtig beurteilt werden müssen. Um unkontrollierten Änderungen der Versuchsbedingungen vorzubeugen, müssen viele Zugeständnisse an die Versuchsanordnung und Versuchstechnik gemacht werden, die in vivo nicht gegeben sind. Die nephelometrische Untersuchungsmethode setzt z.B. eine Präparation des Blutes (Zentrifugieren usw.) und das Arbeiten mit verdünnten Lösungen voraus. Das Arbeiten mit silikonierten Glasgefäßen, pH-Konstanz usw. ergeben sich zwangsläufig aus der Notwendigkeit zufällige Einflüsse (Zeitdauer des Plasma-Glaskontakts, Temperatur usw.) möglichst auszuschalten.

Wenn auch der Sammelbegriff Harnzylinder nicht darüber hinwegtäuschen darf, daß sicher eine Vielzahl verschiedener Faktoren für die Entstehung der verschiedenen Arten von Zylindern im Spiele sein dürften, so könnte doch die Frage, welche Bedeutung Gerinnungsvorgängen dabei zukommt, für Klinik und Therapie von entscheidender Konsequenz sein.

I. THEORETISCHER TEIL

A. Nephelometrie:

1. Definition und Gesetzmäßigkeiten (18)

Es handelt sich um die Messung des emittierten Lichtes, das von Teilchen einer "kolloiden" Lösung durch partielle Ablenkung einer Primärstrahlung hervorgerufen wird. (Tyndalleffekt)

Man unterscheidet:

- a) Streulichtmessungen: Messung des Lichtes, das in einem Winkel (gewöhnlich 90°) zur Primärstrahlung beobachtet wird.
- b) Trübungsmessung: Man mißt die entsprechende Intensitätsschwächung des primär eingestrahlt Lichtes.

Gesetzmäßigkeiten:

Nach der von Rayleigh entwickelten Theorie der Tyndallstreuung ist die von der Volumeneinheit der streuenden Lösung ausgestrahlte Lichtintensität

$$J = \text{prop} \frac{N v^2}{r^2 \lambda^4} J_0 \quad (18)$$

Für die Streulichtmessung hat das Lambert - Beer'sche Gesetz keine Gültigkeit. Es gelten für absolute Messungen (Enc), die für die absolute Spektralphotometrie zu machenden Voraussetzungen, mit Ausnahme der Monochromasie des Lichtes, wenn außerdem die Voraussetzungen für die Gültigkeit der von Rayleigh aufgestellten Formel gewährleistet ist.

N = Zahl der Teilchen/Volumeneinheit

v = Volumen des Einzelteilchens

J = eingestrahlt Lichtintensität

r = Entfernung vom beleuchteten Volumelement

λ = Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes.

prop = Faktor, der die Funktion des Winkels zwischen Primärstrahl und Beobachtungsstrahl enthält.

Der Faktor λ^{-4} erklärt die bekannte Tatsache, daß bei Bestrahlung mit weißem Licht das Streulicht bläulich erscheint, weil vorwiegend die kurzwelligen Komponenten des Lichtes gestreut werden. Die Proportionalität mit dem Quadrat des Volumens, d.h. der 6. Potenz des Durchmessers der Teilchen zeigt, wie stark die Streuung von diesem Faktor abhängig ist. Die Formel gilt nur, solange die Teilchen die Größe von $d < 30 \text{ m}\mu$ nicht überschreiten. Für größere Teilchen gelten empirische Formeln.

Die für Konzentrationsbestimmungen wesentliche Aussage der Gleichung liegt darin, daß die Streuungsintensität bei konstanten äußeren Bedingungen der Teilchenzahl N und damit der Konzentration proportional ist. Dabei ist vorausgesetzt, daß die Teilchengröße (Dispersität) immer dieselbe ist.

Die Beziehungen zwischen Streulichtintensität J und scheinbarer Extinktion E und damit durchstrahlter Schichtdicke d und Konzentration c sind für hinreichend kleine Werte von E linear. In welchen Konzentrations- und Schichtdickenbereichen die Proportionalität zwischen J und E gilt, ist in jedem Fall empirisch zu bestimmen. Innerhalb des linearen Bereiches gilt für die Streuintensität zweier Lösungen verschiedener Konzentration unter sonst gleichen Bedingungen:

$$J_1 = \text{prop} E_1 d_1 ; J_2 = \text{prop} E_2 d_2$$

oder
$$E = c \frac{d_1}{d_2} \text{ bzw. } E \sim \sqrt{\text{prop} E_1 d_1}$$

Trübungsmessungen im oben definierten Sinn einer Messung der scheinbaren Extinktion der trüben Lösung unterscheiden sich prinzipiell nicht von gewöhnlichen Extinktionsmessungen. Es sind also auch bei der Streulichtmessung die dort geltenden Einschränkungen zu ma-

en. Bei der Streulichtmessung müssen außer den Bedingungen des Lambert - Beer'schen Gesetzes noch die der Rayleigh'schen Formel entsprechenden zusätzlichen Größen beachtet werden.

2. Diskussion der physikalischen Faktoren:

a) Die Teilchenzahl N und das Volumen v

Ausgehend von den heute geltenden Vorstellungen über die Struktur des Fibrinogenmoleküls und seiner stufenweisen Umwandlung durch Polymerisationsvorgänge in Fibrin bei der Blutgerinnung, kann man bezüglich der durch Streulichtmessung gewonnenen Kurven einige Aussagen machen:

In einer verdünnten Plasmalösung befinden sich im Idealfall "Fibrinogenmoleküle" von definierter Länge, Dicke bzw. Volumen. Man könnte also unter Berücksichtigung aller anderen Faktoren an eine lineare Abhängigkeit zwischen Fibrinogenkonzentration und gemessenen Extinktionswerten (E_A) denken, wenn man annimmt, daß es sich tatsächlich um eine ideale Fibrinogenlösung im Sinne kleinster Fibrinogeneinheiten handelt, wie das für Lösungen von pH 6,1 wahrscheinlich gemacht werden konnte (17).

Bei Plasmaverdünnungen kommen für die Aktivität der Streuung außer den "Fibrinogenmolekülen" noch andere Plasmaproteinkörper, Lipide usw. in Frage. Diese zusätzliche Streuungsintensität kann als konstant angesehen werden, wenn man von einer etwa unterschiedlich auftretenden "schalenförmigen Plasmaabsorption" an der Oberfläche des "Fibrinogenmoleküls" absieht (17).

Die Fibrinogen-Fibrinumwandlung besteht in dem für die Streulichtmessung wichtigen Aspekt darin, daß aus einer großen Zahl kleiner Teilchen durch Polymerisation eine kleinere Zahl größerer Teilchen entsteht. Dieser Polymerisationsprozeß ist als Gleichgewichtsreaktion

zu verstehen. Man hat also zu gleicher Zeit größere und kleinere Teilchen. D.h. die Forderung für die absolute Streulichtmessung von einheitlicher Dispersität ist nicht gegeben.

Teilchen verschiedener Größe unterscheiden sich durch die Streuung verschiedener Lichtqualitäten (λ_x), die gestreut werden. Bezüglich der Gesamtstreuung J entstehen dadurch sehr unübersichtliche Verhältnisse. Die Summe der in einem bestimmten Volumen vor und nach der Umwandlung vorhandenen Volumina der Einzelbausteine ist konstant. Eine bei der Streulichtmessung auftretende positive Extinktionsänderung kann deswegen nicht als Konzentrationszunahme von Fibrin gewertet werden.

Folgende Überlegungen werden dem wahren Sachverhalt sicher eher gerecht. Nach der Rayleigh'schen Formel hängt J bzw. gemessener E-Wert von der Zahl N der Teilchen und dem Quadrat des Volumens ab.

$$J \sim N \cdot v^2$$

Einer dem Polymerisationsvorgang entsprechenden Abnahme von N auf der einen Seite steht eine quadratisch wachsende Zunahme von v auf der anderen Seite gegenüber, so daß im Endeffekt ein anwachsender Wert von J bzw. gemessener Extinktion resultiert.

Daraus wird verständlich, daß auch gleiche Extinktionswerte keineswegs gleiche Fibrinkonzentrationen bedeuten müssen. Vielmehr muß daran gedacht werden, daß sich der gemessene E-Wert als Summe der gemessenen Streulichtintensitäten darstellt, die durch ganz unterschiedliche Einstellung der Gleichgewichte zwischen den einzelnen Polymerisationsstufen der Fibrinogen--Fibrinwandlung bedingt sein können. Setzt man gleiche Gerinnungsbedingungen zweier Versuche (Ionenmilieu, Temperatur usw.) und gleiche Fibrinkonzentrationen voraus, so

kann mit entsprechenden Gleichgewichten der einzelnen Polymerisationsstufen gerechnet werden, und die gemessenen E-Werte als relatives Maß für die letztlich erreichte "Fibrinkonzentration" gelten. Da ein Einfluß der Fibrinogenkonzentration selbst auf die Einstellung des Gleichgewichts angenommen werden muß, kann bei auch sonst konstant gehaltenen Bedingungen eine lineare Abhängigkeit zwischen Plasmakonzentration und schließlich nach der Gerinnung gemessenen E_E -Wert nicht erwartet werden. Um Fehler bei vergleichenden Versuchen möglichst auszuschalten ist auf Konstanz der vorgegebenen Plasmamenge besonders zu achten. Eine größere Genauigkeit beim Pipettieren kleiner Plasmamengen kann durch Verdünnung einer größeren Plasmamenge erreicht werden. Bezüglich der maximalen Teilchengröße von 30 μ für den Geltungsbereich von E_{90} ist folgendes zu sagen: Über die Teilchengröße der Fibrinstrukturen kann im einzelnen Fall nichts genaues ausgesagt werden. Sie liegt sicher teils innerhalb teils außerhalb des Geltungsbereiches. Schon aus diesem Grunde darf eine einfache Proportionalität zwischen E und Fibrinkonzentration nicht erwartet werden. Unter sonst konstanten Bedingungen können bei dieser relativen Messung größere E_E -Werte als höhere Polymerisationsgrade, kleinere E_E -Werte als kleinere Polymerisationsgrade gedeutet werden.

b) Die eingestrahlte Lichtintensität J_0 und die Wellenlänge des Lichtes

Da die Abhängigkeit der Streuintensität von der Wellenlänge des Lichtes keine spezifische Eigenschaft der streuenden Substanz ist, hat die verwendete Lichtqualität bei nephelometrischen Messungen keine grundsätzliche Bedeutung (18). Die Streuung des Lichtes nimmt in Richtung auf den kurzwelligen Teil des Lichtes stark

zu. Um die durch Intensitätsschwankungen des primär eingestrahlten Lichtes (wechselnde Heizspannung der Spektrallampe) hervorgerufenen Fehler möglichst klein zu halten, werden meist Filter mit einem Durchlaßbereich von 400 - 600 m μ verwandt.

Theoretisch zu berücksichtigen ist noch eine sog. scheinbare Absorption von Licht, die dadurch zustande kommt, daß die an einer Stelle des Volumelements beobachtete Tyndallstrahlung mit steigender Konzentration der streuenden Substanz durch bereits räumlich vorher erfolgte Streuung des Primärlichtes in zunehmendem Maße geschwächt wird. Das gleiche gilt für das Streulicht selbst, das auch sekundär gestreut wird. D.h. die gemessene Streuintensität hängt auch von den Dimensionen des Volumelements und des Tyndallkegels ab. Man kann diese Einflüsse dadurch ausschalten, daß man die Beobachtungen in verschiedenen Entfernungen von der Eintrittsstelle des Primärlichts in die Lösung graphisch darstellt und auf die Entfernung Null extrapoliert (18). Dieser Fehler durch die scheinbare Absorption kann aufgrund der allgemeinen sonstigen Fehlerbreite und im Hinblick auf die nur relative Messung vernachlässigt werden.

c) Streulichtmessung bei gefärbten Dispersionsmittel

Die Farbe der Lösung bewirkt eine zusätzliche wahre Absorption eines Teils des eingestrahlten Primärlichts und verursacht damit auch eine zusätzliche Intensitätsabnahme des Tyndalllichtes, das selbst außerdem noch teilweise absorbiert wird. Bei unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen muß also auch bei gleichbleibender Streuungsaktivität gleichzeitig in Lösung befindlicher Kolloidteilchen konstanter Konzentration mit verschiedenen Werten von J_0 bzw. gemessener Extinktion gerechnet werden.

Verschiedene ΔE -Werte entsprechen dann möglicherweise Änderungen von J_0 (primär eingestrahktes Licht), das durch verschiedene Stärke der Absorption (entsprechend den Farbstoffkonzentrationen) bestimmt ist.

Für unsere Untersuchung der Plasmagerinnung unter Urinzusatz in verschiedenen Konzentrationen bedeutet das folgendes: Wir wollen den Effekt des zugesetzten Urins auf die eigentliche Gerinnung, d.h. die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung bzw. den Polymerisationsgrad des Fibrins feststellen. Dazu müssen wir die allein durch die Absorption des Lichtes durch den Farbstoff bedingte Abnahme der ΔE -Werte ausschalten oder ihrem Betrag nach beurteilen.

Es besteht die Möglichkeit durch Wahl eines entsprechenden Gelbfilters den Absorptionseffekt klein zu halten. Die spektrale Zerlegung des Lichtes durch Einbringung eines definierten Sperrfilters in den Strahlengang bewirkt eine zu starke allgemeine Abschwächung der Primärstrahlung. Unter den vorgegebenen Bedingungen der Apparatur liegt die dann noch vorhandene Streuintensität unterhalb der optischen Reizschwelle der Photozelle.

Bei gelb gefärbten Lösungen unterschiedlicher Konzentration liegt die entsprechend unterschiedliche Absorption vor allem im Bereich des blauen Lichtes (Komplementärfarbe), also im Bereich von etwa 400 - 500 m μ . Die Absorption betrifft in unseren Versuchen teils die Primärstrahlung, teils die Tyndallstrahlung. Die qualitative Zusammensetzung von Primärstrahlung und Tyndallstrahlung ist nicht gleich. Das liegt daran, daß die Streuung des Lichts an Teilchen einer bestimmten Größe für verschiedene Wellenlängen des Lichtes unterschiedlich ist. Die Streuung nimmt, wie bereits erwähnt, nach dem kurzwelligen Teil des Lichtes hin stark zu. Ein be-

stimmter Absorptionsbetrag der Primärstrahlung muss deswegen nicht einem gleich großen Betrag an Tyndallstrahlung entsprechen. Vielmehr wirkt sich eine prozentual geringe Schwächung bezüglich der ursprünglichen Gesamtintensität des Primärlichtes im kurzwelligen Teil des Spektrums sehr viel mehr aus und wird eine prozentual sehr viel stärkere Schwächung der Gesamttyndallstrahlung nach sich ziehen.

Dieser Effekt wird umso stärker ins Gewicht fallen, je kleiner die ursprüngliche Primärstrahlung gegenüber einer durch größere Streuaktivität anwachsenden Tyndallstrahlung wird. Es könnte sich dann gewissermaßen um eine Erschöpfung der vor allem für den Streueffekt verantwortlichen Strahlen kurzer Wellenlänge handeln. D.h. man kommt dabei unter Umständen in einen Bereich, in dem die gemessenen Extinktion nur noch eine Funktion der zur Verfügung stehenden Primärstrahlung J_0 wird. Umso leichter wird man auch dahin kommen, je größer die Schwächung des Primärlichtes durch die Absorption einer steigenden Farbstoffkonzentration gegeben ist.

Mißt man nun die Absorption in % des Primärlichtes J_0 im durchfallenden Licht spektralphotometrisch bei den entsprechenden Urinkonzentrationen und verschiedenen Wellenlängen bzw. Bereichen des Lichtes, so kann man sich etwa ein Bild von den Verhältnissen machen.



Die Lichtdurchlässigkeit (in %) in Abhängigkeit von der Urinkonzentration (ml/5ml Küvettenvolumen) und der Wellenlänge des Lichtes

Auf eine dem Lambert'schen Gesetz entsprechende Voraussetzung der Monochromasie des Lichtes, kommt es daher nicht an. Es sollen ja nicht Konzentrationen, sondern die Lichtschwächung von J_0 gemessen werden.

Aus den Absorptionskurven geht folgendes hervor: Die für die Streulichtmessung wichtigen Komponenten des Lichtes (400 - 450 $m\mu$) werden besonders stark absorbiert. Bei Urinkonzentration $1,6\frac{1}{5}$ liegt im Bereich von 400 - 450 $m\mu$ eine ungefähre 50%ige Absorption der Primärstrahlung vor, die sich noch als wesentlich größere Abnahme des gemessenen ΔE -Wertes auswirken kann. Allerdings kommen natürlich für die Gesamttyndallstrahlung noch die praktisch nicht geschwächten Wellenlängen von 500 - 600 $m\mu$ dazu, so daß im Endeffekt mit einer wesentlich kleineren Abweichung zu rechnen ist. Vergleicht man mit den gewonnenen Kurvenbildern, so ergibt sich, daß $\Delta E = 0$ bei $1,6\frac{1}{5}$ Urin nicht allein durch Absorption erklärt werden kann. Offenbar kommt tatsächlich noch eine Verminderung der Tyndallstrahlung durch eine kleinere Streuaktivität (geringerer Polymerisationsgrad des Fibrins) dazu. Dieser Betrag wäre dann die eigentlich von uns gesuchte Wirkung des Urins auf die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung.

Die Benutzung eines definierten Filters im Bereich des gelben Lichts ist, wie bereits oben erwähnt, nicht möglich. Wie das Bild der Absorptionskurven zeigt, besteht jedoch die Möglichkeit, durch Vorschaltung eines breiteren Filters einen Wellenlängenbereich auszuwählen, bei dem die Absorption durch Urin sehr klein ist. Das ist für den Bereich von 550 - 600 $m\mu$ gegeben. Damit erreicht man, daß die Absorption praktisch Null ist und die noch gegebene Gesamtintensität des Primärlichtes läßt bezüglich der Empfindlichkeit der Photozelle eine Streulichtmessung noch zu.

Schreibt man Kurven unter Vorschaltung eines entsprechenden Filters (Durchlaßbreite 550 - 600 μ), so erhält man Kurvenbilder, die sich von den bei Nephelometerfilter 400 - 600 μ geschriebenen Kurven nicht wesentlich unterscheiden. Man sieht jetzt auch für höhere Konzentrationen von Urin eine wenn auch sehr kleine Änderung von E, die gleichzeitig mit dem Festwerden der verdünnten Plasmalösung auftreten.

Der zu erwartende Absorptionseffekt scheint also nicht wesentlich ins Gewicht zu fallen. Das kann daran liegen, daß offenbar die Relation zwischen vorgegebener Primärlichtintensität und Tyndallstrahlung in unseren Versuchen günstig liegen. D.h. die Tyndallstrahlung ist gegenüber der Primärlichtintensität relativ klein. Das kann als Hinweis auf eine große Genauigkeit der Methode gewertet werden.

B. Theorie der Fibrinogen-Fibrinumwandlung:

Auszug aus Köppel (17): Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin. (Mit freundlicher Genehmigung des Autors)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Funktionsmorphologie des Fibrinogens, des Fibrins und der Thrombozyten beim spontanen Gerinnungsablauf im menschlichen Normalblut einschließlich der Retraktion des Koagulums.
Von Dr. med. Günter Köppel

Seite 30

Morphologie der Fibrinogenfäden (Zusammenfassung).
Die Fibrinogenfäden des Nativblutes sind langgestreckte Teilchen mit einer Länge von 860 bis 100 Å und einer Dicke von etwa 220 Å. Sie bestehen aus 4 bis 5 perlschnurartig aneinandergereihten Fibrinogenknoten, die annähernd sphärische Gestalt besitzen und deren Durchmesser etwa 220 Å beträgt.

Seite 51

Der erste Polymerisationsschritt der Fibrinogen-Fibrinumwandlung ist charakterisiert durch die polare Kettenassoziation von jeweils drei bis acht Fibrinogenfäden und führt zu etwa 220 Å dicken und 3000 bis 6000 Å langen intermediären Fibrinogenketten. Bei exzessiver Verdünnung des Blutplasmas mit physiologischen Salzlösungen dissoziieren die intermediären Fibrinogenketten. Diese Dissoziation wird gefördert durch Salzlösungen mit pH 5,8; sie wird gehemmt durch Salzlösungen mit pH 8,5. Von pH 8,5 bis 5,8 besteht ein Gefälle des Dissoziationsgrades oder der Dissoziationsgeschwindigkeit der intermediären Fibrinogenketten. Die Länge der intermediären Fibrinogenketten ist demnach konzentrations- und pH-abhängig.

Seite 114

Zweiter Polymerisationsschritt:

Die intermediären Fibrinogenketten und die Fibrinogenfäden lagern sich mit Hilfe von seitlich lokalisierten Kräften in der Form einer strukturhomologen Lateralassoziation zusammen; sie formieren die Fibrinfaser.

Seite 115

Der zweite Polymerisationsschritt ist charakterisiert durch ein gleichzeitiges Längen- und Dickenwachstum der Fibrinfasern. Das Dickenwachstum einer Fibrinfaser ist in deren mittleren Bereich bereits abgeschlossen, wenn an den Enden der Faser das Längenwachstum noch weiter fortschreitet. Die endgültige Länge der Fibrinfasern ist im Elektronenmikroskop nicht annähernd zu bestimmen; die endgültige Dicke beträgt für die Verhältnisse im spontan gerinnenden Nativblut etwa 1000 bis 2000 $\overset{0}{\text{\AA}}$.

Es müssen sich also - bezogen auf den Faserquerschnitt - jeweils 15 bis mehr als 60 intermediäre Fibrinogenketten zu einer Fibrinfaser zusammenschließen. Die Fibrinfaserdicke ist bestimmt durch das Ausmaß der strukturhomologen Lateralassoziation von intermediären Fibrinogenketten und von dünnen Fibrinfasern zu dickeren Fasern. Sie ist jedoch nur bis zu einer bestimmten oberen Grenze möglich.

Seite 116

Ein wesentlicher Faktor für die regelrechte Formierung der Fibrinfasern dürfte in der großen Länge der intermediären Fibrinogenketten zu suchen sein. Die intermediären Fibrinogenketten werden unter dem Einfluß der an den Seiten lokalisierten Kräfte des zweiten Polymerisationsschrittes parallelgestellt, und sie formieren so durch strukturhomologe Lateralassoziation die

Fibrinfaser. Die Fibrinogenfäden sind demnach in der Fibrinfaser achsparallel eingebaut. Bei pH 5,0 sind die polar gelegenen Kräfte des ersten Polymerisationsschrittes nicht reaktionsfähig; es können sich demnach keine intermediären Fibrinogenfäden ausbilden. Der erste Polymerisationsschritt erfolgt also nicht, und es werden nicht intermediäre Fibrinogenketten, sondern Fibrinogenfäden durch Thrombin aktiviert. Diese kurzen aktivierten Fibrinogenfäden schließen sich nun in der Form einer lateralen Kettenassoziation zusammen und formieren so Fibrinketten. In den Fibrinketten sind die Fibrinogenfäden quer zur Kettenachse eingebaut.

Seite 107

Das Produkt dieser Polymerisationsmodifikation, die Fibrinkette, unterscheidet sich nicht nur in der Art ihrer Formierung von der Fibrinfaser, sondern auch in ihrem inneren Aufbau und ihren mechanischen Eigenschaften. Mit Hilfe der Thrombelastographie Hartert (1948) wurde der elastische Widerstand von Gerinnseln aus Fibrinogen-Thrombin-Gemischen gemessen, die bei verschiedenen pH entstanden waren. Dabei ergab sich, daß das Fibringerinnsel auf der alkalischen Seite von pH 6,1 relativ fest ist; im Bereich von pH 6,1 bis 6,0 verliert es sehr schnell diese Festigkeit; es wird dehnbar, und auf der sauren Seite von pH 6,0 ist schließlich bei sehr schnell anwachsenden Gerinnungszeiten kaum noch ein Widerstand des Koagulums gegenüber der verformenden Kraft des Thrombelastographen meßbar. Der Übergang vom festen zum leicht verformbaren Koagulum ist trotz der groben Methode der pH-Messung relativ scharf. Daneben war ebenfalls im Bereich von pH 6,0 bis 6,1 ein deutlicher Umschlag in der Transparenz der Gerinnsel für durchfallendes Licht zu beobachten.

Seite 124

Der dritte Polymerisationsschritt stellt sicher die konsequente Fortsetzung des zweiten Polymerisationsschrittes dar, basierend auf gleichen oder sehr ähnlichen Prinzipien; die Polymerisationsprodukte unterscheiden sich indessen in ihrer Morphologie und in ihrem Verhalten.

Seite 136

Am Beginn der Formierung des Fibringerüstes steht die initiale punktförmige Vereinigung einzelner Fibrinfasern. Anschließend vereinigen sich diese Fasern unter dem Zeichen der strukturhomologen Lateralassoziation, solange die Voraussetzung dafür gegeben ist.

Seite 138

Eine strukturhomologe Lateralassoziation ist nur dann möglich, wenn sich zwei Fasern unter einem Winkel von weniger als etwa 45 Grad miteinander vereinigen.

Seite 139

Das geschieht in einer Anzahl von Bereichen des gerinnenden Blutvolumens zwischen vielen in den verschiedensten Richtungen verlaufenden Fibrinfasern und an mehreren Stellen einer jeden Fibrinfaser gleichzeitig oder nacheinander. So formieren sich erste, räumlich begrenzte kleine Fibrinfasergerüste; diese nehmen infolge des fortschreitenden zweiten Polymerisationsschrittes ständig an räumlicher Ausdehnung zu und wachsen so allmählich zu einem vorerst noch lockeren, das ganze Blutvolumen durchsetzenden, einheitlichen Fibrinfasergerüst zusammen: Das Koagulum hat sich formiert.

C. Definition der Gerinnung:

Wenn man Gerinnungszeiten vergleichen will, muß man den Begriff der Gerinnung zweckmäßig definieren. Der Begriff "Gerinnung" bezeichnet zunächst die Erscheinung, daß flüssiges Blut *in vitro* fest wird. Entsprechend ist eine Plasmagerinnung die Erscheinung, daß eine Plasmalösung fest wird. Das wird beobachtet, wenn die für die Gerinnung verantwortlichen chemischen Substanzen (Gerinnungsfaktoren) in hinreichenden Konzentrationen vorhanden sind; bei gleichzeitiger Abwesenheit von gerinnungshemmenden Substanzen (Inhibitoren) oder deren hinreichend kleiner Konzentration.

Man ersieht daraus, daß die definitive Bestimmung, ob eine Gerinnung stattgefunden hat oder nicht schwierig wird, wenn die Fibrinogenkonzentration sehr klein ist. Eine makroskopische Festigkeit wird dann nicht mehr erreicht werden können. Dem Vorgang der Gerinnung entspricht dann eine starke Änderung der Viskosität in relativ kurzer Zeit. Ein solcher Vorgang kann auf verschiedene Weise gemessen werden. Die Streulichtmessung ist insofern in der Lage diesen Vorgang darzustellen, als die Gerinnung selbst auf einem Polymerisationsvorgang beruht, welcher eigentlich registriert wird. Das heißt bei der Streulichtmessung werden nur die optischen Erscheinungen des Gerinnungsvorgangs erfaßt. Ob eine Gerinnung im Sinne von Festwerden der Lösung bei der Streulichtmessung zur Darstellung kommt hängt ab: von der Empfindlichkeit der Apparatur, von der Größenordnung der Teilchen und deren Konzentration.

Daraus ergibt sich, daß auch eine Gerinnung im Sinne einer Viskositätsänderung stattfinden kann, ohne daß bei der Streulichtmessung davon etwas registriert wird. Die sog. Latenzzeit der Streulichtmessung muß also keineswegs immer der eigentlichen "Gerinnungszeit" entsprechen.

II. METHODISCHER TEIL

A. Präparation des Plasmas:

1. Blutentnahme

Jeweils 9 ccm, durch Punktion der vena cubitalis mit einer Kanüle. In einer 10 ccm Spritze (Ultrasept) sind 1 ccm 3,8 % Na-Citr. vorgelegt. (Die innere Oberfläche der Spritze mit Vaseline alba pur. eingefettet). Danach sofort Einwiegen in silikonierte bzw. unbenetzbare Zentrifugengläser und zentrifugieren: 10 Min. bei 15000 U/Min.

2. Konservierung

Das plättchenarme Plasma wird bis etwa 3 mm über dem Bodensatz abpipettiert und jeweils 1,6 ccm Plasma in ein silikoniertes Röhrchen gegeben. Die Röhrchen werden mit Datum und Spender bezeichnet, mit Parafilm verschlossen in das Tiefkühlfach gegeben (-15°C). Die Aufbewahrung des Plasmas in mehreren Röhrchen in der angegebenen Menge hat sich als praktisch erwiesen. Für eine Versuchsreihe benötigt man etwa diese Menge; mehrmaliges Auftauen und Einfrieren des Plasmas erübrigt sich. Bei einer Versuchsserie wird nur Plasma eines Röhrchens verwendet. Die durch unterschiedliche Alterung entstehenden Differenzen können dadurch ausgeschaltet werden.

Wichtig ist weiter: Langsames Auftauen des Plasmas bis auf Zimmertemperatur (45 Min.), anschließend vorsichtige Durchmischung. Das Plasma wurde nicht länger als 7 Tage gelagert.

B. Wahl des Puffers:

I. Phosphatpuffer

Wegen der sehr guten Eigenschaften in Bezug auf seine Pufferkapazität bietet sich eine Phosphatpuffermischung an. Es ist auch möglich bei hinreichend kleiner Pufferkonzentration die Ca-Ionen und sec. Na-Phosphat in Lösung zu halten. Allerdings liegt der pK der zweiten Dissoziationsstufe der Ortho-Phosphorsäure bei 6,7. Will man aber das System im schwach alkalischen haben, so muß man ein ungünstiges Mischungsverhältnis von prim. und sec. Phosphat in Kauf nehmen, was weiter auf Kosten der Pufferkapazität geht. Dazu kommt, daß schon kleinste Mengen von ausfallendem sec. Ca-Phosphat sich im Kurvenbild bei der Streulichtmessung als charakteristische "Rechtsabweichung" während der Latenzzeit bemerkbar machen. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Überlagerung mit der eigentlichen, typischen Gerinnungskurve.

Besonders im Hinblick auf die Untersuchungen mit Zusatz von Urin mit dem stark wechselnden Gehalt an fällbaren Substanzen, erscheint ein solches labiles System ungeeignet.

2. Veronalpuffer

Veronalpufferlösungen haben sich als geeignet erwiesen; sie zeigten keine Fällungsreaktionen, die Pufferwirkung war ausreichend. Die Behringwerke AG. (Marburg/Lahn) haben 2 Diäthylbarbitursäure-Pufferlösungen im Handel (pH 6,7 und pH 7,6).

Es wurde mit dem Puffer 7,6 gearbeitet.

Er enthält:

5,89 g (= 1/35 Mol) Natrium - 5.5 - diäthylbarbiturat/Liter und ist durch Zusatz von HCl und NaCl und CH_3COONa nach der Vorschrift von Michaelis auf den pH-Wert 7,6 und Blut-Isotonie eingestellt.

C. Vorbehandlung des Urins:

Es wurde stets frischer spontan gelassener Urin von gesunden Versuchspersonen verwendet, der durch Zentrifugieren (1500 U/Min. 5 Min.) zellfrei gemacht wurde. Um die Einflüsse durch die bald einsetzende bakterielle Zersetzung auszuschalten, darf der Harn nicht länger als 60-80 Min. bei Zimmertemperatur stehen. Durch Einfrierung konservierter Urin weist stark veränderte Eigenschaften auf und wurde nicht verwendet. Ein konstantes spez. Gewicht von 1015 wurde durch entsprechende Verdünnung mit Aqua dest. erreicht.

D. Apparaturen:

Die Gerinnung von verdünnten Plasmalösungen wurde durch fortlaufende Registrierung der Streulichtintensität nach Ebbecke und Knüchel (5) analysiert. Es wurden dazu das Photometer Eppendorf mit Nephelometeraufsatz und einem heizbaren Küvettenhalter benutzt. Zur Registrierung wurde der "Elektronische Kompensationsschreiber Linecomb" der Firma Hartmann u. Braun verwandt. Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 20 mm für den direkten Strahlengang. Die Streulichtintensität wurde im rechten Winkel zur Primärstrahlung gemessen. Die effektiv durchstrahlte Schichtdicke für das registrierte Streulicht betrug etwa 15 mm.

2. Versuchstechnik und Kurvenauswertung:

1. Versuchsansatz

Normalversuch

Es werden in ein silikoniertes Mischglas folgende Lösungen pipettiert:

- 1.) 0,2 ml Plasma
- 2.) 2,8 ml NaCl phys.
- 3.) 1,0 ml Veronalpuffer

Durchmischung: Das Glas wird 10 mal gekippt.

- 4.) 1,0 ml CaCl_2 -Lösung
(gleichzeitig² Start der Stoppuhr)

Durchmischung: Das Glas wird 10 mal gekippt.

Umgießen aus dem Mischglas in die Küvette.

Start des Schreibers, 1 Min. nach Start der Stoppuhr.

Bemerkung: Die verschiedenen Lösungen stehen in gezeichneten Reagenzgläsern mit gezeichneten Pipetten im Wasserbad bei 37°C . Die Küvette ist ebenfalls vorgewärmt im geheizten Küvettenhalter bei 37°C .

Die Kurve, die bei dem oben angeführten Versuchsansatz geschrieben wird, wird im Folgenden als "Normalkurve" bezeichnet.

1. Charakterisierung der Normalkurve

Man kann 5 Abschnitte unterscheiden:

- 1.) A bis B; Verlauf der Kurve ohne Änderung der Lichtstreuung/ Δt .

(ΔE_x als Variable im Gegensatz zu $\Delta E = E_E - E_A$ sei mit dem Index x gekennzeichnet).

$$\frac{\Delta E_x}{\Delta t} \approx 0$$

- 2.) B bis C; Verlauf der Kurve mit positiver Änderung der Lichtstreuung/ Δt .

$$\frac{\Delta E_x}{\Delta t} = \chi_0 \rightarrow k$$

- 3.) C bis D; Verlauf der Kurve mit annähernd konstanter Änderung der Lichtstreuung/ Δt .

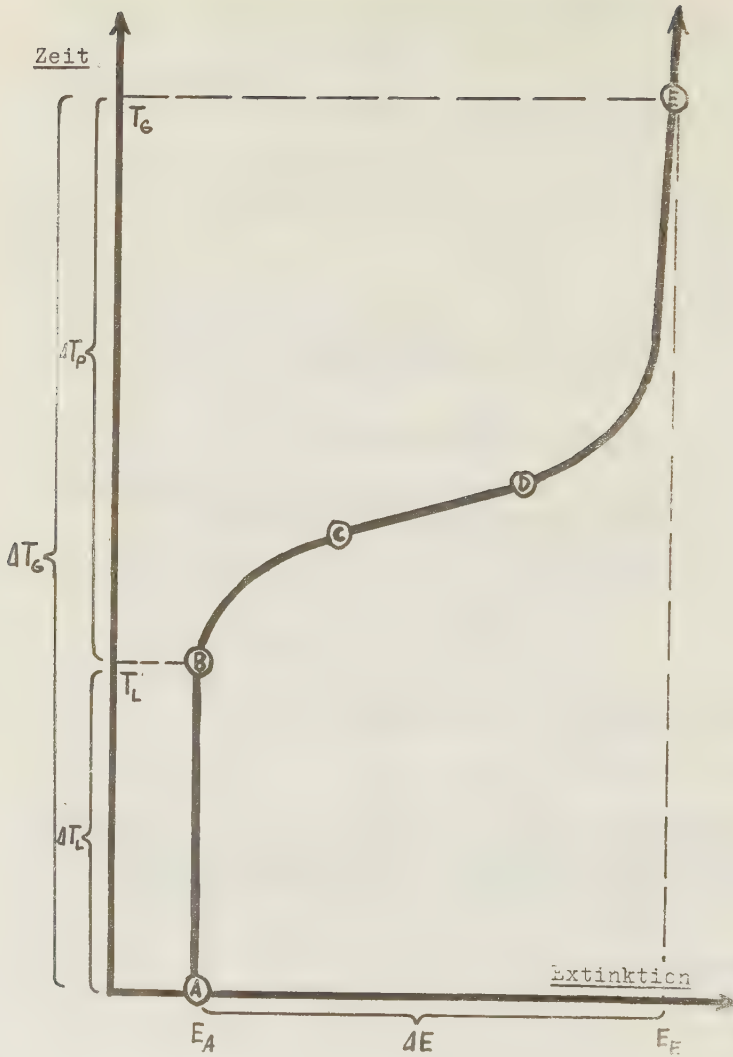
(Pseudolinearer Teil der Kurve)

$$\frac{\Delta E_x}{\Delta t} \approx k$$

- 4.) D bis E; Verlauf der Kurve mit negativer Änderung der Lichtstreuung/ Δt .

$$\frac{\Delta E_x}{\Delta t} = \chi_k \rightarrow 0$$

- 5.) Über E hinaus; Verlauf der Kurve mit sehr kleiner negativer Änderung der Lichtstreuung/ Δt .



Charakterisierung der Normalkurve

a) Extinktionswerte

Der sich zum Zeitpunkt Null der Registrierung einstellende E-Wert wird im folgenden E_A (A=Anfang) genannt. Der schließlich erreichte E-Wert nach Ablauf des Gerinnungsvorganges zum Zeitpunkt T_G heiße E_E (E=Ende). Dabei gilt für die Registrierungen, bei denen ein Gerinnungsvorgang stattfindet: $E_E > E_A$. Die Differenz $E_E - E_A$ soll ΔE heißen. $E_E - E_A = \Delta E$ (ΔE =Kurvenbreite).

b) Zeitwerte

a) Latenzzeit ΔT_L : Die Zeit, die vergeht, bis die erste optisch registrierte Änderung von E auftritt. Also: Für $T_L = T_0$ bis T_L ist $\Delta E = 0$. Ob ΔT_L dem zeitlichen Ablauf der Vorphase des Gerinnungsvorganges entspricht, kann nicht entschieden werden. (Die spezielle Verlängerung von ΔT_L bei Ca^{++} -Überschuß spricht dafür!) Bedacht werden muß, daß die Feststellung eines ΔT_L -Wertes davon abhängt, daß überhaupt eine Kurve geschrieben wird. ($\Delta E = 0$ heißt nicht: keine Gerinnung, wie später gezeigt wird!). Es wird verständlich, daß die Höhe von T_L (in der Kurve!) von der Empfindlichkeit der Registrierung abhängen kann. Bei sehr kleiner Empfindlichkeit der Einstellung kann z.B. ein Teil des Kurvenverlaufs von B ab in den E_A -Wert einschrumpfen. Man erhält also bei gleicher Versuchsanordnung und Einstellung einer kleineren Empfindlichkeitsstufe des Gerätes kleinere Kurvenbreiten (ΔE -Werte!) bei entsprechend verlängerten Latenzzeiten (ΔT_L -Werten!). Somit ist auch die Latenzzeit ΔT_L in wenn auch kleinerem Maße als die Kurvenbreite von dem Empfindlichkeitsgrad der Registrierung abhängig. Wenn überhaupt eine Kurve aufgezeichnet wird, kann ΔT_L in einem kleineren Bereich variieren. $\Delta T_L + \Delta T_x$, wobei $T_x \leq T_p$ ist.

β) Die Polymerisationszeit ΔT_p : Die Zeit, in der eine Änderung von $E_x / \Delta t$ beobachtet wird. Die sehr kleinen Änderungen von $E_x / \Delta t$ über Punkt E der Kurve hinaus bleiben unberücksichtigt. Als Grenze werden Änderungen von $E_x / \text{Min} < 1\% \Delta E$ gesetzt.

γ) Gerinnungszeit ΔT_G = Gesamtgerinnungszeit gemessen vom Zeitpunkt der Rekalzifizierung.

$$\Delta T_G = \Delta T_L + \Delta T_p + 1$$

(Die Registrierung beginnt eine Min. nach dem Zusatz von CaCl_2)

3. Auswertung der Kurven

Über die Bedeutung der einzelnen kurvenabschnitte und des Kurvenverlaufs (Steilheit der Kurve!) kann im einzelnen wenig ausgesagt werden. Immerhin kann man die Kurvenbreite als relatives Maß für den Polymerisationsgrad der Fibrinogen-Fibrinumwandlung und die Latenzzeit als relatives Maß für die Gerinnungszeit ansehen. (T_L ist ein gut definierter Punkt auf der Kurve im Gegensatz zu T_G !) Es wäre daher wenig sinnvoll, eine exakte Analyse der Kurve bis ins Einzelne (z.B. planimetrische Auswertung oder dgl.) vorzunehmen.

Zur Charakterisierung einer Kurvenserie werden jeweils nur zwei Werte herangezogen:

- 1.) Die Latenzzeit ΔT_L
- 2.) Die Kurvenbreite ΔE

In den Diagrammen wird die Latenzzeit ΔT_L durch die Länge eines senkrechten Strichs, die Kurvenbreite durch die Breite eines aufgesetzten Querbalkens wiedergegeben.

4. Streubreite

Schreibt man Kurven einer gleichen Versuchsanordnung zeitlich hintereinander, so erhält man ein Bild von der Genauigkeit der Methode. Die Kurven sind gut reproduzierbar, wenn man nur Plasma eines Röhrchens verwendet. Es ergeben sich dann folgende Streubreiten:

Latenzzeit: $8 \pm 0,3$ Min.

Kurvenbreite: $11 \pm 1,0$ cm

Die Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Latenzzeit ist relativ gut; die ΔE -Werte unterliegen größeren Schwankungen. Vergleicht man Plasma gleicher Präparation, des gleichen Spenders usw., aber aus verschiedenen Röhrchen, so ergibt sich eine wesentlich größere Streubreite, die auf Verunreinigungen zurückgeführt werden muß. Vergleichende Versuche einer Serie wurden deshalb nur mit Plasma aus einem Röhrchen gemacht.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Ionenmilieu und Plasmakonzentration

1. Rekalzifizierungszeit und kalziumionenkonzentration

Als Rekalzifizierungszeit wird die Gerinnungszeit von Zitratblut oder Plasma nach Zusatz von CaCl_2 bezeichnet. Gebräuchlich ist die Zugabe von m/40 CaCl_2 -Lösung im Verhältnis 1:1 zur Plasmamenge. Bei Verwendung von unverdünntem Plasma erhält man eine Latenzzeit von ungefähr 30 Sekunden. Arbeitet man mit verdünntem Plasma, 0,2 ml Plasma auf 5 ml Küvettenvolumen bei der Nephelometrie, so erhält man bei Zusatz von 0,2 ml m/40 CaCl_2 sehr viel längere Gerinnungszeiten.

Es hat sich herausgestellt, daß durch Zusatz von etwa 1 ml m/40 CaCl_2 pro 5 ml Gesamtküvettenvolumen, in dem 0,2 ml Plasma enthalten sind, günstige Versuchsbedingungen - nämlich relativ kurze Latenzzeiten - entstehen.

Es sollte eine CaCl_2 -Lösung hergestellt werden, die folgende Bedingungen erfüllt:

1. Isotonie mit dem Blut
2. einfache Pipettenwerte
3. möglichst kurze Latenzzeiten

Eine 0,102 m CaCl_2 -Lösung kann als dem Blut isotonisch angesehen werden. Um gleichzeitig einfache Pipettenwerte zu erreichen wurde zunächst folgende Lösung angesetzt.

0,306 ml	0,102 m CaCl_2
+0,604 ml	NaCl phys.
1,0 ml	CaCl_2 -Gebrauchslösung

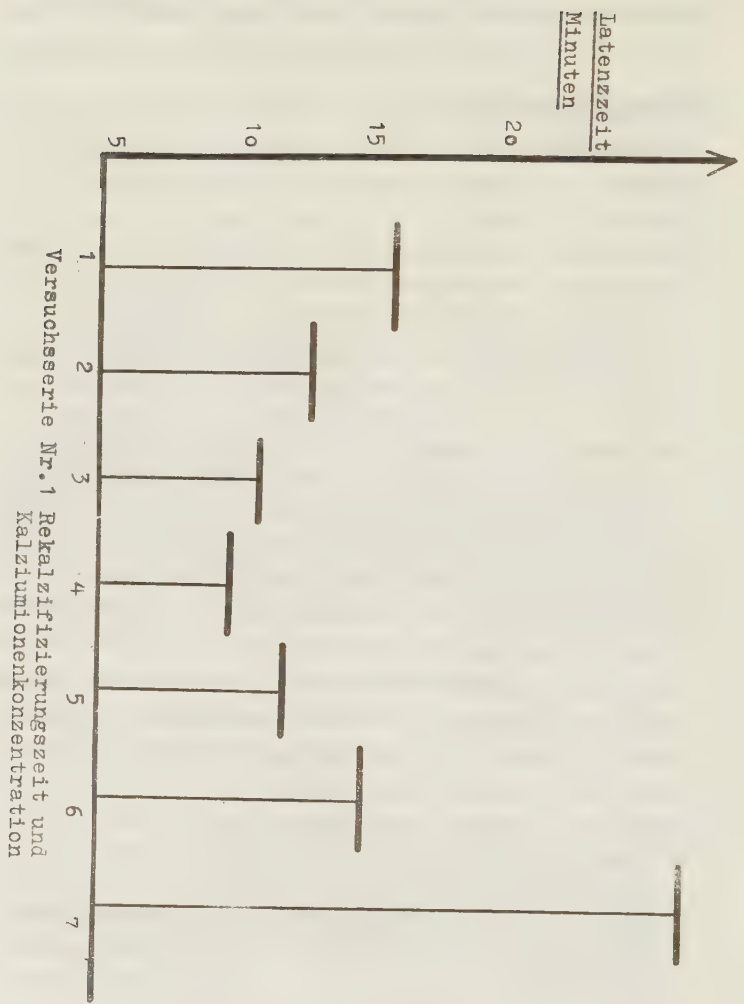
Zur Einstellung auf möglichst kurze Latenzzeiten wurde mit dieser Lösung eine Streulichtmessung gemacht.

Versuchsserie Nr. 1

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Plasma	0,2						
Veronal	1,0						
NaCl phys.	3,67	3,55	3,43	3,30	3,17	2,80	1,80
CaCl ₂	0,13	0,25	0,37	0,50	0,63	1,0	2,0
Latenzzeit	14	11	9	8	10	13	25
Kurvenbreite	10	9,5	9,5	9,0	10	10,5	10,5

Die kürzeste Latenzzeit wurde in Versuch Nr. 4 erreicht. Die Versuche zeigen, daß es bei dieser Versuchsanordnung eine optimale CaCl₂-Konzentration gibt. Wird diese unterschritten, so zeigt sich der "Defekt" des Gerinnungssystems in deutlich verlängerten Latenzzeiten. Andererseits üben auch im Überschuß vorhandene Kalziumionen einen starken Hemmeffekt aus. Bemerkenswert ist dabei noch, daß man bei stark variierenden Latenzzeiten praktisch konstante ΔE -Werte erhält. Diese Erscheinung kann man daraus erklären, daß die Kalziumionen als Faktor der Vorphase der Blutgerinnung ihren Einfluß auf die Einleitung des Gerinnungsvorgangs, nicht aber auf die eigentliche Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin ausüben. Ist dieser Umwandlungsprozeß erst einmal in Gang gekommen, dann läuft er gewissermaßen schematisch ab.

Alle weiteren Versuche wurden mit einer CaCl₂-Lösung gemacht, die in 1ml gleiche Mengen Kalziumionen enthält, wie der bei Versuch Nr. 4 gefundenen optimalen Konzentration entspricht.



Herstellung dieser CaCl_2 -Eichlösung:

30,6 ml	0,102 m CaCl_2
+ 169,4 ml	NaCl phys.
200,0 ml	CaCl_2 -Eichlösung

In jedem Versuchsansatz wird 1ml dieser Lösung hinzugegeben.

Vergleichende Reagenzglasversuche: Rekalzifizierungszeit und Kalziumionenkonzentration

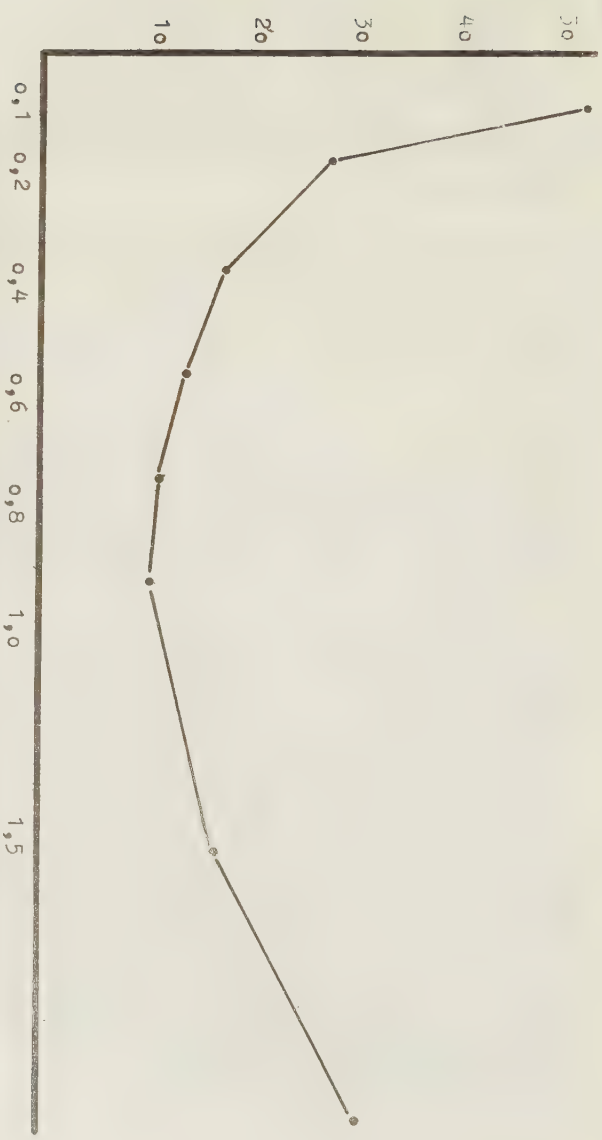
Versuchsserie Nr. 2

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Plasma	0,2							
NaCl phys.	4,7	4,6	4,4	4,2	4,0	3,8	3,3	3,0
CaCl_2	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0
Gerinnungszeit (Min.)	54	26	16	14	12	10	16	28

Als "Gerinnungszeit" wurde die Zeit bestimmt, die vergeht bis der Flüssigkeitsspiegel des betreffenden Röhrchens beim Kippen keine Mitbewegung mehr machte. Der Reagenzglasständer wurde dazu im Abstand von 2 Min. aus dem Wasserbad (37°C) genommen und etwa 15° zur Horizontalen gekippt.

Die Versuche zeigen eine sinngemäße Übereinstimmung mit den photoelektrisch gewonnenen Ergebnissen. Die vergleichsweise größeren Zeitwerte erklären sich daraus, daß bei der Streulichtmessung schon der Anfang der "Fibrinabscheidung" als Latenzzeit gemessen wird, während die Zeitnahme bei den Reagenzglasversuchen die Gesamtgerinnungszeit (Latenzzeit + eigentliche Gerinnungszeit) betrifft.

Gerinnungszeit
Minuten



Versuchsserie Nr. 2 Kalziumionenkonzentration (ml/5ml Küvettenvol.)
und Gerinnungszeit

2. Natrium- und Chlorionenkonzentration

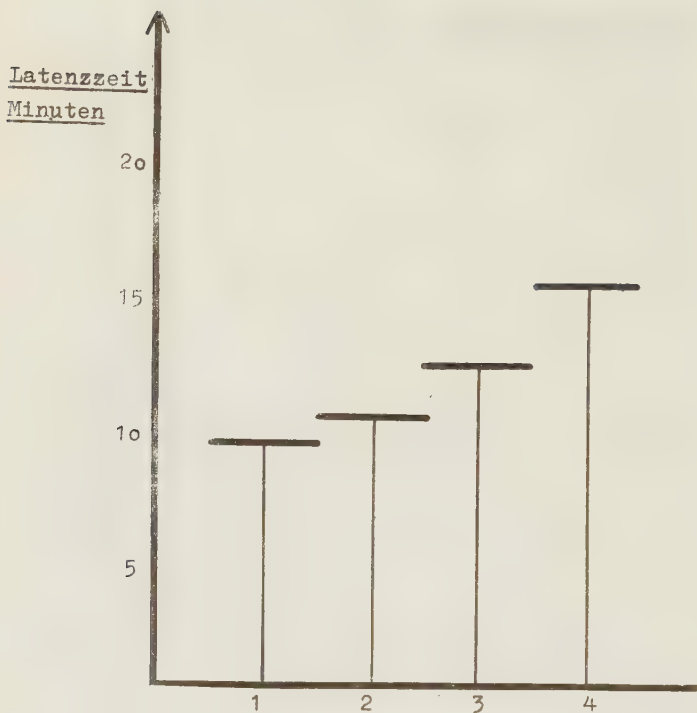
Versuchsserie Nr. 3

Versuch Nr.	1	2	3	4
Plasma	0,1			
Veronal	1,0			
NaCl phys.	0,0	1,0	2,0	3,0
Aqua dest.	3,0	2,0	1,0	0,0
CaCl ₂	1,0			
Latenzzeit	9	10	12	15
Kurvenbreite	10,5	10,5	11	10,5

Die Versuche zeigen, daß bei praktisch gleichen ΔE -Werten die Latenzzeiten mit zunehmender Konzentration von NaCl länger werden. Das zunehmend stärker werdende Ionenmilieu hat offenbar einen allgemein hemmenden Einfluß auf den Gerinnungsvorgang.

Es handelt sich dabei um eine Erscheinung, die in dem von J. Jürgens (13) angegebenen Verfahren des Kochsalztoleranztestes zur Aufdeckung latenter Gerinnungsstörungen praktische Anwendung gefunden hat.

Die Konstanz der effektiv erreichten Streulichtintensitäten können als Hinweis darauf gedeutet werden, daß die Hemmung in diesem Fall die Vorphase der Gerinnung betrifft. Die letztliche Ausbildung eines regulären Fibringerüsts scheint nicht beeinflußt zu sein.



Versuchsserie Nr.3

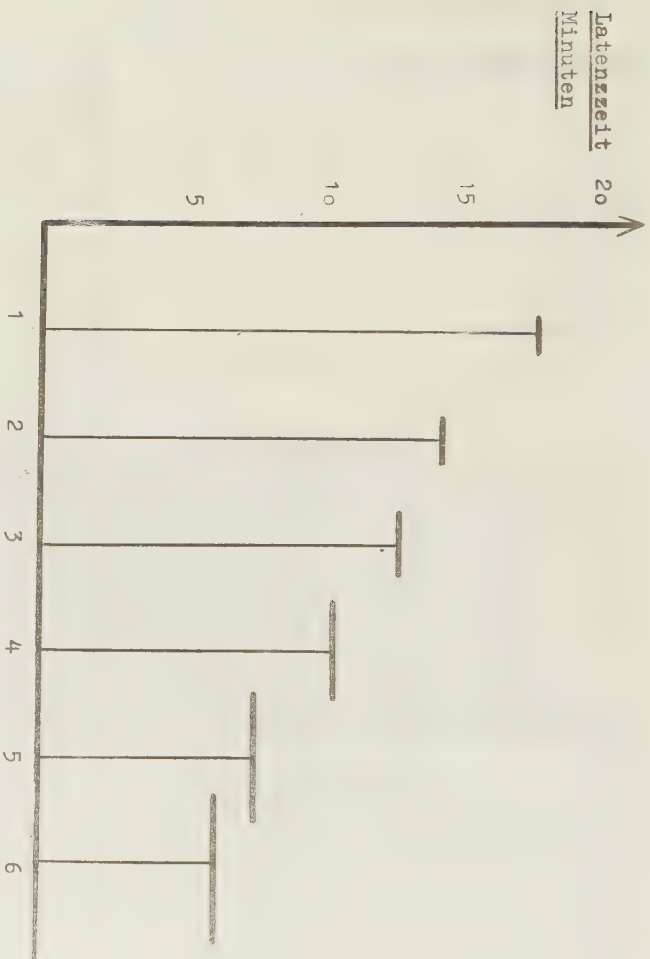
Natrium- und Cloridionenkonzentration

3. Plasmakonzentration

Versuchsserie Nr. 4

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6
Plasma	0,05	0,08	0,1	0,15	0,2	0,4
NaCl phys.	2,95	2,92	2,90	2,85	2,80	2,60
Veronal	1,0					
CaCl ₂ -Lösung	1,0					
Latenzzeit	18,5	19	13,5	11	8	6,5
Kurvenbreite	4	5	7	10	12	13

Innerhalb der beobachteten Grenzen bedingt eine größere Plasmakonzentration eine entsprechend größere Kurvenbreite. Gleichzeitig werden die Latenzzeiten kürzer. Eine absolute Beziehung zwischen Plasmakonzentration und zu erwartenden ΔE -Wert besteht nicht. Die kürzeren Latenzzeiten können als Ausdruck dafür gewertet werden, daß die Gerinnungsfaktoren in höheren Konzentrationen vorhanden sind, und daß sich ein räumlich dichteres Fibrinnetz leichter formieren kann.



Versuchsserie Nr. 4 Der Einfluß der Plasmakonzentration auf Latenzzeit und Kurvenbreite

B. Der Einfluß des Urins

1. Nephelometrische Untersuchungen

Versuchsserie Nr. 5

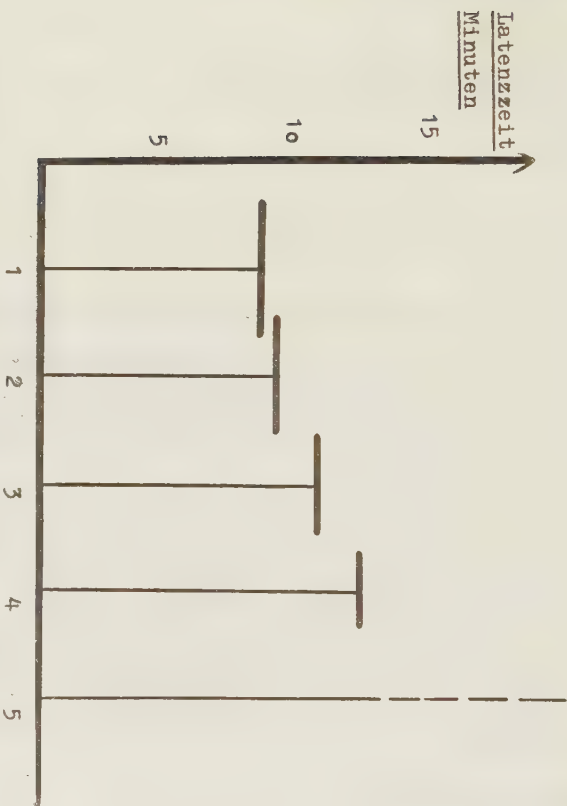
Versuch Nr.	1	2	3	4	5
Plasma	0,2				
NaCl phys.	2,8	2,6	2,4	2	1,2
Veronal	1				
CaCl ₂	1				
Urin	0,0	0,2	0,4	0,8	1,6
Latenzzeit	8,5	9	10,5	12	
Kurvenbreite	12	12	10,5	9	

Die Versuche zeigen: Mit steigender Urinkonzentration werden die Latenzzeiten größer, die Kurvenbreite wird geringer. In Versuch 5 wird kein ΔE -Wert bzw. Latenzzeit gemessen.

Die Versuche zeigen weiter, daß zwischen 4 und 5 ein Sprung bei der stufenweisen Abwandlung der Bedingungen vorliegt. Zwischen der Urinkonzentration von 0,8 bis 1,6/5ml Küvettenvolumen scheint der kritische Wert zu liegen, bei dem ein regelrechter Ablauf der Gerinnung nicht mehr möglich ist. Durch weitere Versuche wurde diese "kritische Urinkonzentration" näher bestimmt.

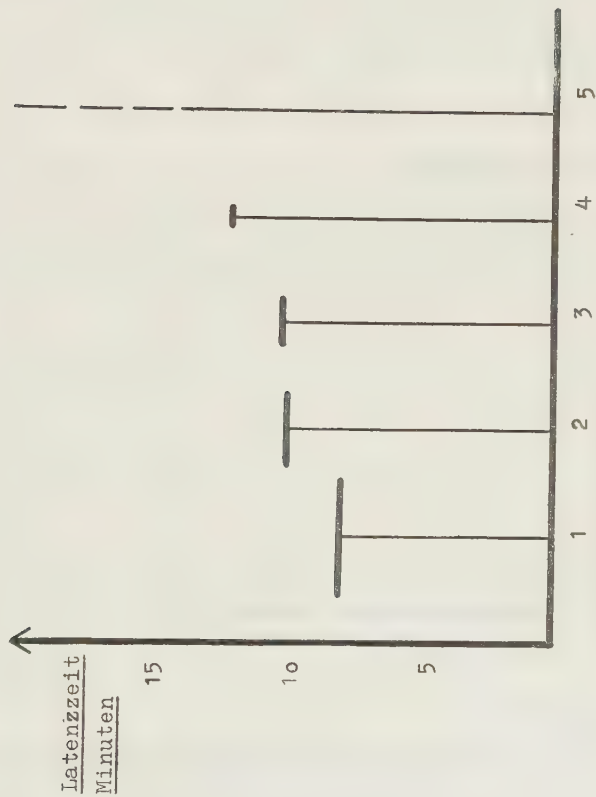
Versuchsserie Nr. 6

Versuch Nr.	1	2	3	4	5
Plasma	0,2				
NaCl phys.	2,8	1,8	1,6	1,4	1,2
Veronal	1				
CaCl ₂	1				
Urin	0,0	1,0	1,2	1,4	1,6
Latenzzeit	8	10	10,5	12	
Kurvenbreite	11	8	5	2	0,0



Versuchsserie Nr. 5

Der Einfluß steigender Urinkonzentrationen
auf die Plasmagerinnung



Versuchsserie Nr. 6

Der Einfluß steigender Urinkonzentrationen
auf die Plasmagerinnung

Die kritische Urinkonzentration, bei der die Apparatur keine Latenzzeiten bzw. ΔE -Werte registriert, liegt unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei 1,5/5ml Küvettenvolumen.

Die charakteristischen Veränderungen des normalen Kurvenverlaufs können durch Urinzusatz zum Gerinnungssystem absolut sicher immer wieder reproduziert werden. Vorausgesetzt ist dabei, daß es sich um frischen Urin handelt.

2. Reagenzglasversuche

Im folgenden soll versucht werden, diese Erscheinungen durch vergleichende Versuche zu deuten und eventuell Artefakte, die in den Bedingungen der Versuchsanordnungen zu suchen sind, auszuschließen.

Finden sich die Latenzzeiten mit den Gerinnungszeiten in Übereinstimmung, die mit einer anderen Methode festzustellen sind? Bedeutet kein ΔE -Wert bzw. Latenzzeit keine Gerinnung?

Bemerkung: Wie beim Auswaschen der Küvetten bereits auffiel, waren auch bei den Versuchen, bei denen keine optische Registrierung einer Gerinnung vorlag, ein Gerinnsel entstanden. Diese Gerinnsel blieben im Gegensatz zu den Normalgerinnseln beim Auswaschen teilweise an der Glaswandung der Küvette haften.

Versuchsserie Nr. 7

Die Versuche wurden in Reagenzglasansätzen wiederholt. Als Gerinnungszeit wurde die Zeit gemessen, die nach der Rekalzifizierung vergeht, bis der Inhalt der Röhrchen eine solche Festigkeit aufwies, daß der Flüssigkeitsspiegel bei waagrechter Lage der Röhrchen keine Mitbewegung mehr machte. (Um diese erforderliche Festigkeit zu gewährleisten, wurde mit 0,4 ml Plasma statt 0,2 ml Plasma gearbeitet).

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Plasma	0,4						
Veronal	1						
NaCl	2,6	2,2	1,8	1,4	1,0	0,6	0,2
Urin	0,0	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4
CaCl ₂	1						
Gerinnungs- zeit:	8	8,5	9	10	15	20	27

3. Der Einfluß des Harnstoffs

Um den Einfluß des Harnstoffs bei der Entstehung der Uringerinnsel isoliert beurteilen zu können, wurden die Versuche mit einer 3,4%igen Harnstofflösung an Stelle von Urin ausgeführt.

<u>Versuchsserie Nr. 8</u>		Streulichtmessung				
Versuch Nr.	1	2	3	4	5	
Plasma	0,2					
NaCl phys.	2,8	1,8	1,6	1,4	1,2	
Veronal	1,0					
CaCl ₂	1,0					
Harnstoff	0,0	1,0	1,2	1,4	1,6	
Latenzzeit	8	8	9	8	9	
Kurvenbreite	10	10	11	11	10	

<u>Versuchsserie Nr. 9</u>		Reagenzglasversuche						
Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7	
Plasma	0,4							
Veronal	1,0							
NaCl phys.	3,0	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0	
CaCl ₂	1,0							
Harnstoff	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
G.-Zeit	8							

Die Versuche zeigen, daß der Harnstoff als isolierter Faktor in einer der Urinkonzentration entsprechenden physiologischen Konzentration den Gerinnungsablauf nicht beeinflusst. Auch fehlen diesen Gerinnungen die Eigenschaften, die für die Uringerinnung charakteristisch sind.

4. Bewertung der Versuche

Der Einfluß von Urin auf die Plasmagerinnung

a) Streulichtmessungen

Bei der Streulichtregistrierung der Gerinnung von verdünntem Plasma können unterschiedliche ΔE -Werte bei konstanter Plasmakonzentration und unter Berücksichtigung aller anderen Faktoren der Methode als Ausdruck verschiedener Gleichgewichtszustände der Polymerisationsstufen von Fibrinogen bzw. Fibrin angesehen werden. Ein größerer Polymerisationsgrad entspricht dabei einem größeren ΔE -wert. Es dürfen nur Kurven einer Serie verglichen werden; es handelt sich um eine relative Messung.

Die Anwesenheit von Urin bei der Plasmagerinnung in verdünnter Lösung bewirkt bis zu einer kritischen Konzentration eine stufenweise Abnahme des Polymerisationsgrades der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung. Gleichzeitig wird dadurch eine mäßige Verlängerung der Latenzzeiten bewirkt. Höhere Konzentrationen von Urin bewirken einen sehr kleinen ΔE -Wert bei gleichzeitig stark anwachsenden Gerinnungszeiten. Die Transparenz der Gerinnung wird schließlich so groß, daß überhaupt keine Änderung der Streulichtintensität bei der Gerinnung beobachtet wird. Der Zeitpunkt des Gerinnungseintritts kann mit der Streulichtmessung dann nicht mehr bestimmt werden.

b) Reagenzglasversuche

Die Versuche zeigen entsprechend den Befunden der Streulichtmessungen, daß bei steigenden Urinkonzentrationen die Gerinnungszeit größer wird. Bei der stufenweisen Erhöhung der Urinkonzentrationen liegt der Punkt der starken Verlängerungen der Gerinnungszeiten in dem Bereich der "kritischen Urinkonzentration", bei der keine ΔE -Werte bei der Streulichtmessung registriert wurden.

Es tritt also in jedem Fall eine wenn auch stark verzögerte Gerinnung auf, Gerinnung in dem Sinn, daß die Lösung geliert. Die Deutung der Kurven, die durch die Streulichtregistrierung des Gerinnungsvorgangs gewonnen wurden, muß also differenziert werden: Die Streulichtmessung registriert nur einen optischen Effekt der Gerinnung. Zwischen dem optischen Effekt der Änderung der Streulichtintensität und dem mechanischen Effekt der Viscositätsänderung besteht zwar im allgemeinen eine Parallelität. Diese Beziehungen gelten aber offenbar nur dann, wenn der Polymerisationsmodus in verschiedenen Versuchen derselbe ist. So wird es verständlich, daß höhere Plasmakonzentrationen (Versuchsserie Nr. 4) größere ΔE -Werte bedingen, oder umgekehrt veränderte Kalziumionenkonzentrationen und NaCl-Konzentrationen (Versuchsserie Nr. 1 und Nr. 3) bei konstanter Plasmakonzentration keine Änderung der ΔE -Werte hervorrufen. Anders liegen die Verhältnisse, wenn die Fibrin-Polymerisation durch die Wirkung bestimmter Substanzen anders abläuft. Es bestehen dann keine direkten Beziehungen zwischen mechanischer Festigkeit und Streulichtintensität. Dementsprechend bedeuten unterschiedlich große ΔE -Werte bei konstanter Plasmakonzentration eine dem Ausmaß nach verschieden stark gestörte Polymerisation. Wenn bei der Streulicht-

messung keine Änderung der Streulichtintensität beobachtet wird, so kann das bedeuten: Keine Gerinnung oder Gerinnung ohne messbare Änderung des optischen Verhaltens durch einen von der Normalgerinnung abweichenden Gerinnungsmodus.

C. Verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Uringerinnseln

1. Festigkeit und Elastizität

Der Versuch mit der Drahtöse: Man geht mit einer Drahtöse etwa 1cm tief in das Gerinnsel ein, dreht die Öse einmal um 360° und versucht das Gerinnsel nach oben aus dem Reagenzglas herauszuziehen. Das gelingt entweder: vollständig (+++), teilweise (++bzw.+) oder überhaupt nicht (-).

Versuchsansatz und Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Aus der Tabelle ersieht man, daß mit steigenden Urinkonzentrationen die Zerreißbarkeit der Gerinnsel zunimmt.

2. Wasserretension und Retraktion

Der Stampfversuch: Die Gerinnsel werden mit einem Glasstab am Boden des Reagenzglases zu einem Klümpchen zusammengestampft. Das gelingt entweder: leicht (+++), schwerer (++bzw.+) oder überhaupt nicht (-).

Versuchsansatz und Ergebnisse in Tabelle 2

Die Versuche zeigen, daß die Retraktionsfähigkeit bzw. die Tendenz sich zu retrahieren mit steigender Urinkonzentration abnimmt.

Der Filterpapierversuch: Man kippt die Gerinnsel in toto aus dem Reagenzglas auf einen Bogen doppelten Filterpapier in Abständen von 15cm. Man mißt dann die Zeit in Minuten, in der das Filterpapier die Flüssigkeit durchläßt.

sigkeit aus den Gerinnseln aufgesaugt hat und die Fibrinmasse als Häutchen flach auf dem Filterpapier zu liegen kommt.

Versuchsansatz und Ergebnisse in Tabelle 3.

Die Versuche zeigen, daß die Zeit, die benötigt wird um die Flüssigkeit aus den Gerinnseln aufzusaugen, mit steigender Urinkonzentration größer wird oder anders ausgedrückt: Das Wasserbindungsvermögen nimmt mit steigenden Urinkonzentrationen zu.

Die Versuche wurden im Reagenzglas ausgeführt. Die Ansätze wurden jeweils 40 Min. bei 37°C inkubiert.

2. Oberflächenhaftung und Rigidität

Es wurden jeweils 5 Ansätze im Reagenzglas 30 Min. bei 37°C inkubiert.

<u>a) Normalgerinnssel</u>	<u>b) Uringerinnssel</u>
Plasma 0,5	Plasma 0,5
NaCl phys 2,5	NaCl phys 1,0
Veronal 1,0	Veronal 1,0
CaCl ₂ 1,0	CaCl ₂ 1,0
	Urin 1,5

Der Jodversuch: Die Gerinnssel werden vorsichtig mit 1ml 5%iger alkoholischer Jodlösung überschichtet. Dann wird zentral durch die überschichtete Lösung hindurch ein kleiner Spatel etwa 1-1,5cm tief in das Gerinnssel vorgeschoben und vorsichtig wieder herausgezogen.

- a) Bei Normalgerinnsseln hat sich nach Entfernung des Spatels ein dunkler Farbstoffkeil inmitten des Gerinnsels gebildet.
- b) Bei Uringerinnsseln entsteht kein solcher Keil. Die geleeartige Masse wird durch den vorgeschobenen Spatel auseinandergedrängt und schmiegt sich lückenlos an die Spatelspitze an. Beim Herausziehen schließt sich die Lücke durch den von allen Seiten einwirkenden hydrostatischen Druck.

Auch für diesen Effekt scheint das unterschiedliche Wasserbindungsvermögen und die Retraktionstendenz von Normal- und Uringerinnsseln ausschlaggebend zu sein. Bei den Normalgerinnsseln entsteht durch Auseinanderdrängung der Fibrinstrukturen ein Defekt, in den das Wasser aus der Umgebung einströmt. Das Jod fällt aufgrund der veränderten Löslichkeitsverhältnisse teilweise aus und bildet durch diesen Niederschlag den Farbstoffkeil.

Haftung an der Glaswand: Man überschichtet im Reagenzglas die Gerinnssel mit einer spezifisch schwereren Flüssigkeit (z.B. konzentrierte Harnstoff- oder Zuckerlösung) und dreht das Glas einmal kurz mit einer schnellen Bewegung um die Längsachse.

- a) Normalgerinnssel lösen sich leicht von der Wand ab und steigen nach oben.
- b) Uringerinnssel bleiben an der Wand haften. (Verwendet man eine gefärbte Lösung zum Überschichten, so kann man das Vordringen der Lösung zwischen Glaswand und Gerinnssel beobachten).

4. Auflösbarkeit in Harnstoff

Es wurde folgende Lösung verwandt:

100 cm³ 30%ige Harnstofflösung
+ 1,25 cm³ 80%ige Thioglykolsäure (HS-CH₂-CO₂H)

a) Normalgerinnssel		b) Uringerinnssel	
Plasma	0,5	Plasma	0,5
NaCl phys	2,5	NaCl phys	1,0
Veronal	1,0	Veronal	1,0
CaCl ₂	1,0	CaCl ₂	1,0
		Urin	1,5

30 Min. bei 37°C inkubiert

Auf Filterpapier werden die Gerinnssel ausgepreßt und zu Röllchen gedreht.

Zur Auflösung in die Harnstofflösung mit Thioglykolsäurezusatz bei 37°C.

Tabelle 4

Minuten	20	40	80
a) <u>Normal-</u> <u>gerinnsel</u>			partielle Lyse
b) <u>Urin-</u> <u>gerinnsel</u>	partielle Lyse	totale Lyse	

Die Normalgerinnsel zeigten erst nach 24 Stunden eine totale Lyse.

IV DISKUSSION

Die unter Urinzusatz entstandenen Gerinnsel zeigen große Ähnlichkeit mit denen, die Ferry (7) und Shulman (1949) fanden und als "fine clot" bezeichneten. Diese Gerinnsel erhielten sie bei extrem hohen ph und hoher Ionenstärke (ionic strength). Die "fine clot" zeichnet sich durch geringe Opaleszenz, hohe Rigidität und geringe Tendenz zusammenzuhalten aus.

Die im Gegensatz zur "fine clot" bei Erniedrigung der ionic strength und ph gefundene sog. "coarse clot" zeigt gewisse Ähnlichkeiten mit den Gerinnseln, die ohne Urinzusatz entstanden waren; nämlich starke Opaleszenz, geringere Rigidität, größerer innerer Zusammenhalt.

Verschiedene Autoren (7,17,31) fanden für Plasma-gerinnungen bei ph -Werten $> 6\text{ph}$ eine vergleichbar sehr geringe Opaleszenz. Untersuchungen über die Teilchengröße des Fibrinogens ergaben dabei übereinstimmend sehr kleine Größenordnungen. Auch die elektronenoptisch gewonnenen Ergebnisse von Köppel (17) bestätigen diese Beobachtungen. Nach Köppel werden diese Ergebnisse so erklärt, daß unterhalb des kritischen ph -Wertes keine "intermediären Fibrinogenketten" gebildet werden können und die Gerinnung sozusagen unter Umgehung des ersten Polymerisationsschrittes der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung erfolgt, deren Ergebnis die "Fibrinketten" sind.

Dem Einfluß extremer ph -Werte auf den Gerinnungsvorgang gleicht die Wirkung bestimmter chemischer Substanzen, wie Harnstoff, Guanidin, Histamin und eine Reihe von Stoffen, die sich durch den Besitz von einer oder mehreren Hydroxylgruppen auszeichnen (7).

So fand Laki (20,1942), daß die Zugabe von kleinen Mengen KMnO_4 zu einer Fibrinogenlösung die Polymerisation verhindern bzw. hemmen kann. Dabei wurde bei kleinen Konzentrationen von KMnO_4 selektiv zunächst die "End-zu-End-Polymerisation", später erst die "Lateralpolymerisation" betroffen. Er vermutete, daß es sich um eine irreversible Inaktivierung einer spez. aktiven Gruppe des Fibrinogens durch Oxydation handelte.

Shulman, Ehrlich, Ferry (27,1951) fanden auf Grund der Bestimmung von Sedimentationskonstanten und Viskosität eine reversible Depolymerisation von Fibrinogen, die durch Hexamethylenglykol und Harnstoff hervorgerufen werden.

Steiner (32), Laki (1951) benutzten Streulichtmessungen zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Dimensionen des Fibrinogenmoleküls. Fibrin, das in Harnstoff (6M) und Guanidinhydrochlorid (3M) aufgelöst wurde, zeigte ein Molekulargewicht, das dem des Fibrinogens sehr nahe ist.

Shulman, Herwig Ferry (29,1951) untersuchten die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin: Influence of ionic strength and thrombin concentration on the effectiveness of certain reversible inhibitors.

Summary

The effectiveness of hexamethyle glycol and urea as reversible inhibitors of the conversion of fibrinogen to fibrin, as measured by the initial slope of a plot of logarithm of clotting time against concentration or by the minimum inhibiting concentration, is markedly increased by increasing ionic strength and slightly decreased by increasing concentration of thrombin. A similar effect of ionic strength is found for inhibition by pentamethylene glycol and guanidine. The influence of ionic strength is attributed to an enhanced

binding of the inhibitor by fibrinogen or intermediate polymer thereof-essentially a salting-out-effect.

Shulman, Ferry, Tinoco (30,1953) machten Sedimentationsbestimmungen, Viskositäts- und Streulichtmessungen.

Auszug aus der Zusammenfassung

The results are interpreted in terms of the effect of ph and ionic strength on the ionization of certain histidine residues which, it is postulated, must be uncharged to allow activated fibrinogen to form the intermediate polymer, and in terms of van der Waals' interaktion of the glycol with the surface of the fibrinogen molecule, which at low concentrations impedes the aggregation of the intermediate polymer and at higher concentrations impedes the formation of the polymer itself.

In allen genannten Arbeiten wird gezeigt, daß der Polymerisationsgrad der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung abhängt von ph, Ionenstärke und der Wirkung von bestimmten Inhibitoren. Der isolierte Einfluß von ph und Ionenstärke auf die Gerinnungszeit und Opaleszenz des Gerinnsels wurde von Shulman (28) und Ferry (1950) bereits untersucht.

In den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit wurde das ph 7,6 konstant gehalten; das ist ein ph-Bereich, in dem mit einem hohen Polymerisationsgrad des Fibrinogens zu rechnen ist. Die Ionenstärke schwankt durch die Zugabe des Urins in verschiedener Menge in engen Grenzen, als daß sie für die starke Abnahme des Polymerisationsgrades bei Uringerinnseln verantwortlich gemacht werden könnte. In der oben genannten Arbeit von Shulman (28) werden sehr viel höhere Konzentrationen (von NaCl), die ebenfalls eine Hemmung der Polymerisation hervorrufen können, angegeben.

Als Ursache für den geringeren Polymerisationsgrad der Uringerinnsel kann also an die spezifische Wirkung eines oder mehrerer "Inhibitoren" gedacht werden, die im Urin enthalten sein müssen. Harnstoff ist als solcher Inhibitor bereits näher gekennzeichnet worden (32). Die minimale Konzentration, die gerade noch eine feststellbare Hemmung bewirkt (minimum inhibiting concentration), liegt jedoch noch über der im Urin gegebenen Konzentration (32). Damit in Übereinstimmung befinden sich die Ergebnisse der Versuche, in denen der Urin durch eine entsprechend konzentrierte Harnstofflösung ersetzt wurde. Die isolierte Wirkung des Harnstoffs als Inhibitor kann, jedenfalls bei der gegebenen Versuchsanordnung, ausgeschlossen werden. Es fällt aber doch auf, daß die Wirkungsweise des bisher nicht identifizierten Inhibitors auf die Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung der Wirkung der Substanzen Harnstoff, Guanidinhydrochlorid usw. (in höheren Konzentrationen!) oder dem Effekt von extremen ph-Werten absolut gleicht.

Möglicherweise handelt es sich bei den Uringerinnseln um eine Polymerisationsmodifikation, wie sie von Köppel (17) als "Fibrinkette" beschrieben wurde.

Dafür sprechen die starke Transparenz bzw. schwache Opaleszenz der Uringerinnsel und die herabgesetzte Resistenz gegenüber der Auflösung in Thioglykolsäure-Harnstofflösungen. Auch die Rigidität, die typische geleeartige Glitschigkeit und die Eigenschaft der Uringerinnsel Wasser zu retinieren, können aus dem andersartigen kolloidosmotischen Zustand eines strukturell veränderten Fibrin-Polymerisationsproduktes erklärt werden. Bei der Entstehung bestimmter Kristalloide Harnzylinder wie z.B. Harnsäurezylinder könnte die Eigenschaft der Uringerinnsel Wasser zu binden von entscheidender kausaler Bedeutung sein; etwa in

der Weise, daß die Wasserbindung der Uringerinnsel zur Überschreitung der Löslichkeitsgrenze bestimmter Substanzen (Harnsäure, Kalziumsalze) führt und damit zur intratubulären Ausfällung dieser Substanzen als sog. Harnzylinder.

Theorie der Harnzylinderbildung

Nach den in der Diskussion gemachten Feststellungen wäre demnach für die Entstehung der Harnzylinder folgender Mechanismus denkbar:

Durch eine glomeruläre oder tubuläre Zellschädigung (toxisch, infektiös-toxisch, hypoxämisch usw.) kommt es zum Austritt von Gerinnungsfaktoren und Fibrinogen in das exkretorische System der Nierenkanälchen. Die Bedingungen, die nun auch tatsächlich zum Ablauf eines Gerinnungsvorganges führen oder aber die Gerinnung verhindern, sind komplexer Natur und bedürfen im einzelnen noch genauer Klärung (8). Tatsache ist, daß es zu einer Gerinnung kommen kann und zwar vorwiegend in den distalen Tubulusabschnitten und Sammelkanälchen. Die Ursache für diese typische Lokalisation ist vielleicht die geringere Strömungsgeschwindigkeit in diesen Abschnitten oder durch die notwendige Zeitdauer des Gerinnungsvorganges und den damit verbundenen distalen Abtransport bedingt.

Es kommt jedenfalls zur Bildung von Gerinnungsprodukten in einem anatomischen Bereich der Niere, in dem der Sekretions-bzw.-Konzentrationsvorgang und damit der aktive Einfluß der Zellen auf das Sekretionsprodukt im wesentlichen abgeschlossen ist.

Die gleichzeitige Anwesenheit von bestimmten "Inhibitoren" im Harn oder deren pathologisch hohe Konzentration bewirken eine "Defektgerinnung", die sich besonders durch ein starkes Wasserbindungsvermögen und eine mangelhafte Retraktion auszeichnet. Es bestehen

Hinweise, daß der Harnstoff als solcher "Inhibitor" wirken kann. Durch die Wasserbindung der "Defektgerinnsel" kann es gleichzeitig zur Ausfällung anderer harnpflichtiger Substanzen (z.B. Harnsäure, Kalziumphosphat usw.) kommen, wenn diese bereits vorher in kritischen Konzentrationen vorlagen, indem durch die Wasserbindung der "Uringerinnsel" die Löslichkeitsgrenze für diese Substanzen überschritten wird. Das heißt ohne die gleichzeitige Bildung von "Urin- oder Defektgerinnseln" wären diese Substanzen durchaus in Lösung geblieben. Man könnte auch sagen, es kommt nur deswegen zu Ausfällungen mit der typischen Lokalisation, weil sich die Niere in diesem anatomischen und funktionellen Teil des exkretorischen Systems nicht oder doch nur ungenügend auf die veränderten Konzentrationsverhältnisse einstellen kann. Letztlich wäre die Ursache für die Ausfällung bestimmter Stoffe als Harnzylinder: der Plasmaaustritt und die Entstehung von "Defektgerinnseln".

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Urin auf die Gerinnung von verdünntem thrombozyten-armen Plasma untersucht. Die Gerinnung, die unter Urinzusatz entstanden waren, zeigten bei der Streulichtuntersuchung eine stark verminderte Opaleszenz bei verlängerten Gerinnungszeiten. Bei verschiedenen anderen Untersuchungen, die im Reagenzglas ausgeführt wurden, ließen sich charakteristische Unterschiede zwischen Uringerinnungen und Normalgerinnungen aufzeigen.

2. Als Ursache für die veränderten Eigenschaften der Uringerinnung, nämlich die starke Transparenz, die Rigidität, das starke Wasserbindungsvermögen, die herabgesetzte Resistenz gegenüber der Auflösung in Thioglykolsäure-Harnstofflösung, wird eine Hemmung der Fibrinogen-Fibrin-Polymerisation angenommen. Der von der normalen Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung abweichende Polymerisationsmodus ist auf die Wirkung einer oder mehrerer im normalen Urin enthaltenen bisher nicht näher definierten Substanzen zurückzuführen.

3. Es wird zum Schluß dargelegt, daß dem Wasserbindungsvermögen der Uringerinnung für die Entstehung von sog. Harnzylindern möglicherweise eine kausale Bedeutung zukommt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Astrup, T., J. Sterndorff, Proc. Soc. exp. Biol. 81 (1952), 675
2. Bayer, O., Arch. Heilk. 9 (1864), 136
3. Burkarts, Die Harnzylinder, Berlin (1874)
4. Burmeister, Th., Virchows Arch. path. Anat. 137 (1894), 430
5. Ebbecke, V., F. Knüchel, Pflügers Arch. ges. Physiol. 243 (1939), 54
6. Ernst, P., Beitr. Path. Anat. u. Allg. Path. 12 (1893), über
das Vorkommen von Fibrin in Nierenzylindern
7. Ferry J. D., Shulman S., J. Am. Chem. Soc. 71, 3198 (1949)
8. Frey J., Jürgens J., Untersuchungen über die Bedingungen
zur Bildung von Harnzylindern.
Med. Klinik (Zschr.) 14: 560-567 (1964)
9. Hennig N., Klinische Laboratoriumsdiagnostik, München (1960)
10. Herrman, W. R., Med. Bild-Dienst (Zschr.), Roche, (1964), 1, 12
Der sog. Harnsäureinfarkt der Niere.
11. Israel, O., Virchow Arch. path. Anat. 123, 328
12. Jackson, H., Amer. J. Path. 3 (1927), 3
13. Jürgens, J., Blut (Zschr.) 2: 301-314 (1955)
14. Kaulla, K. N. von, Thrombosis. Biath. Haemorrh. 9 (1963), 53
15. Key, A., Forhadlg. Skand. naturförsch. Kjöbenhavn (1860), 184
16. Kickhöven, B., F. E. Struwe, B. Braunfeld, O. Westphal
Z. Biochem. 330 (1958), 467
17. Köppel G., Die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin (1962)
18. Kortüm G., Kolorimetrie u. Spektralphotometrie (1948), 65
19. Langhans, Virchows Arch. path. Anat. 79 (1880), 311
20. Laki K., Studies Inst. Med. Chem., Univ. Szeged 2: 27 (1942)
21. Lehmann C. J., Virchow Arch. path. Anat. 36 (1864) 125
22. Lubarsch, O., Zbl. allg. Path. u. path. Anat. 4 (1893), 209
23. Mac Farlane R. G., J. Pilling, Nature (London) (1947), 779
24. Ploug J., N. O. Kjeldgaard, Arch. Biochem. 62 (1956), 500
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 24 (1957), 278
25. Quenzel, U., Ark. inre Med. (Stockholm) 50, 2 (1918), 319
26. Senator, Virchows Arch. path. Anat. 60 (1874), 476
27. Shulman S., Ehrlich P., Ferry J. D., An intermediate in the
conversion of fibrinogen to fibrin.
J. Amer. Chem. Soc. 73: 1388-1389 (1951)

28. Shulman S., Ferry J.D., The conversion of fibrinogen to fibrin. Influence of pH and ionic strength on clotting time and clot opacity.
J. Phys. Coll. Chem. 54:66-75 (1950)
29. Shulman S., Herwig W.C., Ferry J.D., The conversion of fibrinogen to fibrin. Influence of ionic strength and thrombin concentration on the effectiveness of certain reversible inhibitors
Arch. 32:354-358 (1951)
30. Shulman S., Ferry J.D., Tinoco J., The conversion of fibrinogen to fibrin. Influence of pH and ionic strength and hexamethylene glycol concentration on polymerisation of fibrinogen.
Arch. Biochem. Biophys. Acta. 42:245 (1953)
31. Siegel B.M., Merman J.P., Scheraga H.A., The configuration of native and partially polymerized fibrinogen
Biochem. Biophys. Acta. 11:329, (1953)
32. Steiner R.F., Laki K., Light scattering studies on the clotting of fibrinogen.
Arch. Biochem. 34:24-37 (1951)
33. Weigert, Die diffuse Nephritis, Berlin (1879)

LEBENS LAUF

Am 28. März 1938 wurde ich als dritter Sohn des Dr. med. Johannes Fröhlich und seiner Ehefrau Dr. med. Maria Fröhlich geb. Wörner zu Frankfurt am Main geboren. Ich besuchte die Praunheimer Volksschule, die Wöhlerschule und die Ziehlenschule, an der ich zu Ostern 1959 das Abitur machte.

Dem Beispiel meiner Eltern folgend entschied ich mich für ein Medizinstudium und wurde 1959 an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main immatrikuliert. 1961 bestand ich das Physikum und studierte anschließend ein Semester in Wien. 1962 führte ich mein Studium an der Frankfurter Universität fort.

Nach dem 11. Semester habe ich mich jetzt zum Staatsexamen gemeldet.

Frankfurt am Main, den 25.8.1964

Guise Fröhlich

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Prof.Dr.med.W.Amelung	Innere Medizin
Prof.Dr.med.,Dr.med.dent.,Dr.phil.W.Artelt	Geschichte d.M.
Prof.Dr.med.H.Betke	Hygiene
Prof.Dr.med.H.G.Boenninghaus	Hals-,Nasen-,Ohrenheilkunde
Prof.Dr.med.H.Cramer	Frauenheilkunde
Prof.Dr.phil.M.Czerny	Physik
Privatdozent Dr.med.R.Degkwitz	Psychiatrie und Neurologie
Prof.Dr.med.P.Duus	Psychiatrie und Neurologie
Prof.Dr.phil.nat.K.Egle	Botanik
Prof.Dr.med.J.Frey	Innere Medizin
Prof.Dr.med.H.Frick	Anatomie
Prof.Dr.med.R.Geißendörfer	Chirurgie
Prof.Dr.med.J.Gerchow	Gerichtsmedizin
Prof.Dr.phil.H.Giersberg	Zoologie
Prof.Dr.med.O.Grüner	Gerichtsmedizin
Prof.Dr.med.E.Güntz	Orthopädie
Prof.Dr.rer.nat.W.Halbsguth	Botanik
Prof.Dr.med.E.Heinz	Physiologie
Prof.Dr.med.F.Herrmann	Dermatologie
Prof.Dr.med.K.Herzberg	Hygiene und Bakteriologie
Prof.Dr.med.H.Hildebrand	Innere Medizin
Privatdozent Dr.med.H.H.Hirsch	Chirurgie
Prof.Dr.med.F.Hoff	Innere Medizin
Prof.Dr.med.P.Holtz	Pharmakologie
Prof.Dr.med.J.Jürgens	Innere Medizin
Prof.Dr.med.G.Kahlau	Pathologie
Prof.Dr.med.O.Käser	Frauenheilkunde
Prof.Dr.phil.W.Kuhl	Zoologie
Prof.Dr.med.C.Kulenkampff	Psychiatrie und Neurologie
Prof.Dr.med.E.Landes	Dermatologie
Prof.Dr.med.H.Lapp	Pathologie
Prof.Dr.med.B.Leiber	Kinderheilkunde

Prof. Dr. med. G. Leonhardi	Dermatologie
Prof. Dr. med. W. A. Lieb	Augenheilkunde
Prof. Dr. med. K. Luff	Gerichtsmedizin
Prof. Dr. med. R. Mittermaier	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Prof. Dr. rer. nat. H. A. Müser	Physik
Prof. Dr. med. R. Ortmann	Anatomie
Privatdozent Dr. med. J. E. Otto	Augenheilkunde
Prof. Dr. med. K. L. Radenbach	Innere Medizin
Prof. Dr. phil. nat. B. Rajewsky	Biophysik
Prof. Dr. phil. nat. E. Rausch	Psychologie
Prof. Dr. med. G. Rossberg	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
Prof. Dr. med. W. Rotter	Pathologie
Prof. Dr. phil. nat. P. Royen	Chemie
Privatdozent Dr. med. O. Schmith	Sozialhygiene
Prof. Dr. med. R. Schneider	Anatomie
Privatdozent Dr. med. K. Schöffling	Innere Medizin
Prof. Dr. med. A. W. Schwenzer	Frauenheilkunde
Prof. Dr. med. D. Starck	Anatomie
Prof. Dr. med. F. Strnad	Röntgendiagnostik
Prof. Dr. med. R. Thiel	Augenheilkunde
Prof. Dr. med. E. Ungeheuer	Chirurgie
Privatdozent Dr. med. W. Weber	Chirurgie
Prof. Dr. med. K. Weiße	Kinderheilkunde
Prof. Dr. med. E. Westermann	Pharmakologie
Prof. Dr. med. K. Wezler	Physiologie
Prof. Dr. phil. Th. Wieland	Chemie
Prof. Dr. med. H. Zimmermann	Pathologie
Prof. Dr. med. J. Zutt	Psychiatrie und Neurologie

Meine akademischen Lehrer in Wien:

Prof. Dr. med. J. Böck	Augenheilkunde
Titularprof. Dr. med. H. Braitenberg	Frauenheilkunde
Univ.-Doz. Dr. med. E. Gitsch	Frauenheilkunde
Prof. Dr. med. H. Kunz	Chirurgie
Prof. Dr. med. E. Lauda	Innere Medizin
Prof. A. P. Dr. med. R. Ullik	Zahnheilkunde

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Nephelometrische Untersuchungen über die Wirkungsweise gerinnungsaktiver Substanzen im Urin" in der II. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. J. Jürgens durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die Ergebnisse meiner Arbeit wurden auszugsweise in der Zeitschrift "Medizinische Klinik" (14:560, 1964) veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 25.8.1964

Joachim Trautwein

